

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA TREVISAN

**CLIPPING UNGUEAL NA ONICOMICOSE E SUA CORRELAÇÃO COM
ACHADOS DE CULTURA**

CURITIBA
2016

FLÁVIA TREVISAN

***CLIPPING* UNGUEAL NA ONICOMICOSE E SUA CORRELAÇÃO COM
ACHADOS DE CULTURA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna, no Programa de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração Medicina Interna, do Setor de Ciências de Saúde, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Betina Werner

CURITIBA
2016

T814 Trevisan, Flávia

Clipping ungueal na onicomicose e sua correlação com achados de cultura / Flávia Trevisan. – Curitiba, 2016.
99f. ; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Betina Werner

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Doenças da unha. 2. Onicomicose. 3. Microscopia. I. Werner, Betina. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

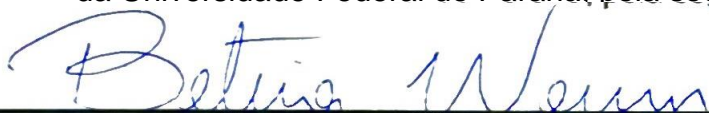
NLMC: WR475

TERMO DE APROVAÇÃO

FLÁVIA TREVISAN

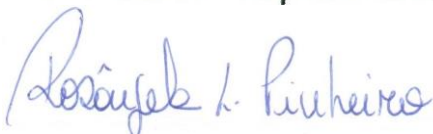
CLIPPING UNGUEAL NA ONICOMICOSE E SUA CORRELAÇÃO COM ACHADOS DE CULTURA

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna, no Programa de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração Medicina Interna, do Setor de Ciências de Saúde, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Professora Doutora Betina Werner

Orientadora – Departamento de Patologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná



Professora Rosângela Lameira Pinheiro

Coorientadora – Laboratório de micologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná



Professora Doutora Katia Sheylla Malta Purim

Departamento de Dermatologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná



Professor Doutor Luis Eduardo Agner Machado Martins

Departamento de Dermatologia, Hospital Evangélico de Curitiba, Faculdade de Medicina Evangélica de Curitiba

Curitiba, 28 de novembro de 2016.

Dedico esse trabalho aos que me ensinaram a ler e a escrever; aos que me proporcionaram a melhor educação possível; aos que me deram os melhores exemplos de resiliência; aos que me indicaram o caminho; aos que me estimularam a sempre ir em frente: meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Ao maior exemplo de conquistas e academicismo, minha orientadora, mestre e amiga Prof. Dra. Betina Werner, pelos ensinamentos, estímulo e conselhos.

À professora Rosangela Lameira Pinheiro, pela ajuda e apoio no aprendizado da micologia.

Ao colaborador André Alex Antunes, responsável pelas ótimas confecções e colorações das lâminas.

Ao Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, seus professores, funcionários e todos os seus integrantes, pelo acolhimento e auxílio em todos os momentos.

Aos colegas e residentes do Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda sem a qual esse trabalho seria inimaginável.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, seus professores, colaboradores e demais alunos, em especial à querida Valéria, pelos serviços prestados muitas vezes além de suas funções.

Aos funcionários da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda na realização dos exames micológicos.

Ao Daniel, pelo apoio e companhia nas muitas horas de estudo.

Ao querido Douglas, pela ajuda nas conferências dos dados.

Aos pacientes, pela participação na pesquisa e por suas palavras de incentivo.

“You can’t get away from fungi. The spores are in the air around you right now. But we don’t notice them until they make an obvious appearance.”

Steven L. Stephenson

RESUMO

Fundamentação: A onicomicose, ou micose das unhas, pode acometer até 14% da população, sendo mais frequente em idosos. Os métodos mais empregados para diagnóstico são o exame micológico direto e a cultura para fungos, porém esses métodos tem baixa sensibilidade. Em auxílio, surgiu o *clipping* com valores de sensibilidade e valores preditivos altos. Métodos: Foi elaborado um estudo observacional e descritivo de 62 amostras de onicomicose coletadas por *clipping* e coradas por PAS, com objetivo de caracterizar critérios da unha e dos fungos, descrevendo e comparando com resultados das culturas. Resultados: Medidas de espessura da placa superiores a 0,50 mm e da região subungueal acima de 0,31 mm são fortemente indicativas de onicomicose. Também são indicativos paraceratose granular, maior número de camadas de paraceratose subungueal, fendas, linha da zona de transição ungueal borrada e irregular, lagos serosos e neutrófilos. Pequena quantidade de fungos, estruturas similares a brotamento, hifas septadas, ramificações e dimorfismo indicam maior probabilidade de dermatófitos. Menores medidas da espessura da placa, ausência de neutrófilos, ausência de camadas de paraceratose, presença de fungos na placa e presença de estruturas leveduriformes agrupadas são sugestivas de infecção por *Candida* sp. Casos causados por *Aspergillus* sp. apresentam mais fendas e linha da zona de transição ungueal irregular. Conclusão: O exame microscópico da unha é um excelente método diagnóstico para onicomicose, com as vantagens de ajudar nos diferenciais da onicomicose, gravidade da contaminação ungueal, direcionamento da investigação do agente etiológico e potencial para previsão prognóstica.

Palavras-chave: *clipping*, exame microscópico de unha, onicomicose, fungos, dermatófitos, doenças das unhas.

ABSTRACT

Background: Onychomycosis, or mycosis of the nails, may affect up to 14% of the population, being more frequent in the elderly. The most widely used diagnostic methods are direct mycological examination and culture for fungi, but these methods have low sensitivity. Clipping however has high sensitivity and good predictive value. **Methods:** An observational and descriptive study of 62 samples of onychomycosis collected by clipping and stained by PAS was designed in order to characterize nail and fungi and to describe and compare the results of cultures. **Results:** Thickness measurements of the upper plate to 0.50 mm and subungual region above 0.31 mm are strongly indicative of onychomycosis. They are also indicative of granular parakeratosis, further layers of subungual parakeratosis, clefts, line blurred and irregular unguis transition zones, serous lakes and neutrophils. A small amount of fungus, similar structures budding, septate hyphae, branching and dimorphism indicate a greater likelihood of dermatophytes. A smaller than average plate thickness, the absence of neutrophils, the absence of layers of parakeratosis, the presence of molds on the plate and the presence of yeast grouped structures are suggestive of infection by *Candida* sp. Cases caused by *Aspergillus* sp. have more clefts and an irregular line of the unguis transition zone. **Conclusion:** Microscopic examination of the nail is an excellent diagnostic method for onychomycosis, with the advantages of helping to determine differential diagnosis, measuring severity of nail contamination, directing the investigation of the etiological agent and potentially leading to prognostic prediction.

Keywords: clipping, microscopic nail exam, onychomycosis, fungi, dermatophytes, nail disease

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA ARTROSPORAÇÃO (1400X). -----	21
FIGURA 2 –	ESTRUTURAS ANATÔMICAS DA UNHA.-----	22
FIGURA 3 –	A. ONICOMICOSE SUBUNGUEAL DISTAL-LATERAL. B. ONICOMICOSE BRANCA SUPERFICIAL. C. ONICOMICOSE DISTRÓFICA TOTAL. D. ONICOMICOSE COM PARONÍQUIA. ----	24
FIGURA 4 –	FRAGMENTO DE UNHA COLETADO POR MEIO DE <i>CLIPPING</i> . A. COLETA COM TESOURA DELICADA. B. COLETA COM CORTADOR DE UNHA.-----	37
FIGURA 5 –	MATERIAL COLETADO EM PLACA DE PÉTRI ESTÉRIL POR MEIO DE CURETAGEM DA PORÇÃO SUBUNGUEAL DA UNHA-----	37
FIGURA 6 –	DIVISÕES DA UNHA: PLACA, ZONA DE TRANSIÇÃO UNGUEAL E REGIÃO SUBUNGUEAL (PAS, 20X). -----	40
FIGURA 7 –	CRITÉRIOS ANALISADOS NA PLACA: ESPESSURA DA PLACA. (PAS, 10X) -----	44
FIGURA 8 –	CRITÉRIOS ANALISADOS NA PLACA: FENDAS. (PAS, 10X) -----	45
FIGURA 9 –	CRITÉRIOS ANALISADOS NA PLACA: ONICOCARIOSE. (PAS, 10X) -----	46
FIGURA 10 –	CRITÉRIOS ANALISADOS NA PLACA: PARACERATOSE GRANULAR. (PAS, 40X)-----	46
FIGURA 11 –	CRITÉRIOS ANALISADOS NA DEFINIÇÃO DA ZONA DE TRANSIÇÃO UNGUEAL. A. BORRADA. B. NÍTIDA. (PAS, 20X)-----	47
FIGURA 12 –	CRITÉRIOS ANALISADOS NA LINEARIDADE DA ZONA DE TRANSIÇÃO UNGUEAL: ARQUEADA IRREGULAR. (PAS, 10X) ---	48
FIGURA 13 –	CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: ESPESSURA DA CAMADA SUBUNGUEAL. (PAS, 10X) -----	49
FIGURA 14 –	CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: LAGOS SEROSOS. (PAS, 20X)-----	50
FIGURA 15 –	CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: NEUTRÓFILOS. (PAS, 100X) -----	50

FIGURA 16 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: CAMADAS DE PARACERATOSE. (PAS, 40X)-----	51
FIGURA 17 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: PRESENÇA DE BACTÉRIAS. (PAS, 100X)-----	52
FIGURA 18 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO <i>CLIPPING</i> : ESTRUTURAS LEVEDURIFORMES COM BROTAMENTO. (PAS, 100X) -----	54
FIGURA 19 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO <i>CLIPPING</i> : SEPTOS. (PAS, 100X)-----	55
FIGURA 20 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO <i>CLIPPING</i> : ARTROSPORAÇÃO. (PAS, 100X) -----	55
FIGURA 21 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO <i>CLIPPING</i> : RAMIFICAÇÕES. (PAS, 100X)-----	56
FIGURA 22 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO <i>CLIPPING</i> : A. HIFA REGULAR. B. DISMORFISMO. (PAS, 100X)---	57
FIGURA 23 – UNHA COLETADA POR <i>CLIPPING</i> APÓS COLETA POR CURETAGEM. NA METADE DIREITA DA AMOSTRA, NÃO É POSSÍVEL ANALISAR TODOS OS CRITÉRIOS (PAS, 2X). -----	65
FIGURA 24 – POLIMORFISMO DO <i>T. RUBRUM</i> . A. HIFA SEPTADA HIALINA REGULAR. B. HIFA COM ARTROSPORAÇÃO (SUPERIOR). C. ESPOROS ARREDONDADOS COM NÚCLEOS VISÍVEIS. D. HIFA DISMÓRFICA, IRREGULAR. E. ESTRUTURAS ARREDONDADAS, LEVEDURIFORMES. F. HIFA DILATADA. G. HIFA TORTUOSA E COM DILATAÇÕES. H. ESPOROS ARREDONDADOS E ESTRUTURAS SIMILARES A LEVEDURAS COM BROTAMENTO. (PAS, 100X) -----	79
FIGURA 25 – MORFOLOGIA DO <i>ASPERGILLUS</i> SP. A. HIFA TORTUOSA, COM ASPECTO DE TORCIDA E COM RAMIFICAÇÃO. B. DILATAÇÃO (CLAMIDOSPORO). C. HIFA COM DILATAÇÕES. D. HIFA DISMÓRFICA. (PAS, 100X)-----	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DA ONICOMICOSE E SEUS PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS	24
TABELA 2 – VALIDAÇÃO DO <i>CLIPPING</i> ENTRE OS ESTUDOS	33
TABELA 3 – MÉDIAS E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS CRITÉRIOS, ENTRE AS CULTURAS POSITIVAS, NEGATIVAS E O TOTAL	58
TABELA 4 – MÉDIAS DE ESPESSURA DA PLACA, DE ESPESSURA SUBUNGUEAL E DE CAMADAS DE PARACERATOSE, E NÚMERO DE CASOS EM RELAÇÃO À AUSÊNCIA E A PRESENÇA DOS CRITÉRIOS, PARA CADA RESULTADO DE CULTURA.	59
TABELA 5 – VALORES DE <i>P</i> NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DE CULTURAS POSITIVAS E NEGATIVAS.....	61
TABELA 6 – VALORES DE <i>P</i> NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DE CULTURAS COM <i>T. RUBRUM</i> E <i>ASPERGILLUS</i> SPP.	61
TABELA 7 – VALORES DE <i>P</i> NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DE CULTURAS COM <i>T. RUBRUM</i> E <i>CANDIDA</i> SPP.....	62
TABELA 8 – VALORES DE <i>P</i> NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DE CULTURAS COM <i>ASPERGILLUS</i> SPP. E <i>CANDIDA</i> SPP.	62
TABELA 9 – CRITÉRIOS DA PLACA UNGUEAL EM CASOS DE ONICOMICOSE.	66
TABELA 10 – CRITÉRIOS DA ZONA DE TRANSIÇÃO UNGUEAL EM CASOS DE ONICOMICOSE.	67
TABELA 11 – CRITÉRIOS DA REGIÃO SUBUNGUEAL EM CASOS DE ONICOMICOSE.	68
TABELA 12 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS ESTUDOS DE ONICODISTROFIA EM PACIENTES COM PSORÍASE (PSORÍASE UNGUEAL) E DE ONICOMICOSE.	70
TABELA 13 – CRITÉRIOS DE DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DOS FUNGOS EM CASOS DE ONICOMICOSE.....	74

LISTA DE SIGLAS

DMSO – dimetil-sulfóxido

DP – desvio-padrão

KOH – hidróxido de potássio (potassa)

PAS – *periodic acid Schiff* (ácido periódico de Schiff)

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

LISTA DE ABREVIATURAS

µm – micrômetro
Inc. – incorporation
mg – miligrama
Med – média
mm - milímetro
p. – página
sp. – espécie
spp – espécies
T. – *Trichophyton*
Var – variância

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

® – marca registrada

μ – micra

% – porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo geral	18
1.1.1	Objetivos específicos	18
1.2	JUSTIFICATIVA	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	FUNGOS	20
2.2	ONICOMICOSE	21
2.2.1	Agentes etiológicos	23
2.2.2	Clínica	23
2.2.3	Tratamento	25
2.3	DIAGNÓSTICO DAS ONICOMICOSSES	25
2.3.1	Exame micológico direto	26
2.3.2	Cultura de fungos	26
2.3	<i>CLIPPING</i>	28
2.3.1	Processamento	29
2.3.2	Análise	30
2.3.3	Validade diagnóstica do <i>clipping</i>	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	DESCRIÇÃO DO ESTUDO	35
3.2	SELEÇÃO DOS PACIENTES	35
3.2.1	Critérios de inclusão	35
3.2.2	Critérios de exclusão	36
3.3	COLETA DAS AMOSTRAS	36
3.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	38
3.4.1	Exame micológico direto	38
3.4.2	Culturas	38
3.4.3	<i>Clippings</i>	39
3.5	ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS <i>CLIPPINGS</i>	39
3.5.1	Análise da unha	39
3.5.2	Análise das estruturas fúngicas	41

3.6	ANÁLISE DOS DADOS	42
4	RESULTADOS	43
4.1	PANORAMA GERAL	43
4.2	ANÁLISE DA UNHA	44
4.2.1	Placa	44
4.2.2	Zona de transição ungueal	47
4.2.3	Análise da camada subungueal	48
4.3	FUNGOS	52
4.3.1	Distribuição	52
4.3.2	Morfologia	53
5	DISCUSSÃO	64
5.1	PONTOS ESSENCIAIS	77
6	CONCLUSÃO	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	90
	ANEXO 1 – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA	92
	ANEXO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA ONICOMICOSE EM DIFERENTES ESTUDOS	94
	ANEXO 3 – PRINCIPAIS CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE DERMATÓFITOS	96
	ANEXO 4 – AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGENS	97
	ANEXO 5 – SUBMISSÃO DE ARTIGO EM REVISTA INDEXADA INTERNACIONAL	98
	ANEXO 6 – PARECER DE APROVAÇÃO	99

1 INTRODUÇÃO

A infecção fúngica das unhas, ou onicomicose, pode ser causada por fungos filamentosos dermatófitos, fungos filamentosos não dermatófitos hialinos, fungos filamentosos não dermatófitos demácios e por leveduras. Os agentes mais comuns são os dermatófitos, em especial o *Trichophyton rubrum* (ZAITZ et al, 2010; ARENAS, 2014). A incidência gira em torno de 14%, com um estudo Norte-Americano realizado em 23 centros e 1832 pacientes, medindo 13,8% (GHANNOUM et al, 2000). De todos os acometimentos ungueais vistos nos consultórios dermatológicos, metade é devido à onicomicose. Acomete igualmente os gêneros e sua incidência aumenta com a idade, sendo rara em crianças e muito comum em idosos (TOSTI, 2014).

Há comprometimento na qualidade de vida dos pacientes com onicomicose, com os piores índices nos casos com maior duração (TURNER; TESTA, 2000; MILOBRATOVIC et al, 2013; BELYAYEVA et al, 2013). Além disso, há preocupação com as possíveis complicações desencadeadas pelo comprometimento da barreira cutânea ao redor das unhas acometidas por infecções fúngicas, com relatos de Milobratovic et al (2013) de evolução para celulite, osteomielite, sepse e necrose tissular em idosos e em diabéticos.

Outras onicopatias, como psoríase ungueal, líquen plano ungueal, onicólise traumática, paroníquia bacteriana e verruga vulgar subungueal podem mimetizar clinicamente a infecção fúngica ungueal. Como o tratamento é completamente diferente nesses casos, é essencial o diagnóstico correto da onicomicose. Além dos diagnósticos diferenciais, a confirmação diagnóstica também é imprescindível para decisão terapêutica, já que em muitos casos há indicação de uso de antifúngicos orais por períodos prolongados, o que traz riscos de hepatite medicamentosa, interações com outras drogas, óbito e mais outros efeitos colaterais indesejados (GHANNOUM et al, 2000).

Exame micológico direto e cultura para fungos são os dois métodos mais tradicionais para a investigação e confirmação diagnóstica da onicomicose. O material geralmente é coletado por meio de curetagem da região subungueal, de preferência na porção da transição entre a unha sã e a unha comprometida. Parte desse material é analisada por microscopia direta com hidróxido de potássio (exame

micológico direto) e parte é semeada em meios de cultura (ZAITIS et al, 2010). O exame micológico direto também pode ser associado à clorazol black, *calcoflúor white*, ou ácido periódico de Schiff (PAS – *periodic acid Schiff*) modificado (HAJAR et al, 2016). Outras formas de investigação são a microscopia confocal, a citometria de fluxo e a reação em cadeia da polimerase (CHAUVIN, 2005). Outro exame em ascensão é a microscopia da borda livre ungueal – ou *clipping* – corada com PAS, objeto deste estudo.

O termo *clipping* é uma palavra em inglês derivada do verbo “to clip”, que designa o ato de cortar a unha com tesoura ou cortador apropriado e passou a ser empregado na literatura médica para designar a coleta da borda livre da unha para análise microscópica. O procedimento é simples e rápido. O desconforto durante a coleta do material para estudo é mínimo e altamente tolerável, sendo um método indolor, sem sangramento e sem necessidade de cuidados extras. A unha é cortada na sua porção distal e livre, e o fragmento resultante é processado de modo que seja possível o corte no micrótomo e posterior coloração por histotecnica (WERNER; ANTUNES, 2013).

Apesar de o *clipping* ter os maiores valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos dentre os métodos de diagnóstico da onicomicose (WEINBERG et al, 2003; JUNG et al, 2005; KARIMZADEGAN-NIA et al, 2007; HAGHANI et al, 2013), a maioria dos estudos encontrados na literatura são de comparação entre as validades dos testes, faltando dados da descrição do que pode ser visualizado na microscopia da borda livre ungueal na onicomicose.

Assim, esse estudo inédito visou ampliar a utilidade do *clipping* na onicomicose para além da mera confirmação da presença de fungos, incluindo nas suas abrangências a descrição das alterações ungueais e da morfologia dos fungos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Aprofundar a análise microscópica tanto da unha quanto dos fungos, nos casos de onicomicose estudados pelo método do *clipping*, descrevendo e comparando-a com os resultados das culturas.

1.1.1 Objetivos específicos

a) Descrever os achados microscópicos da onicomicose investigados pelo método do *clipping*.

b) Comparar as alterações ungueais e a morfologia dos fungos com os resultados de cultura.

1.2 JUSTIFICATIVA

É grande a estimativa da população que será infectada por dermatófitos em algum momento da vida, sendo a forma clínica mais comum das dermatofitoses a tínea ungueal (GHANNOUM et al, 2000). Além do comprometimento da qualidade de vida dos pacientes portadores de onicomicose nos háluces, também há preocupação com as complicações, como celulite, osteomielite, sepse e necrose tissular (MILOBRATOVIC et al, 2013).

O tratamento é geralmente longo e dispendioso, com riscos de efeitos adversos graves. Assim, a confirmação diagnóstica é essencial. Os métodos diagnósticos clássicos são o exame micológico direto e a cultura para fungos. Esses métodos tem baixa sensibilidade, sendo um problema os altos índices de falsos negativos encontrados (GOMEZ-MOYANO et al, 2014). Além disso, a agilidade e a disponibilidade desses métodos em meios acadêmicos estão muito longe da rotina dos consultórios médicos, que convivem com coletas inadequadas, escassez de material e despreparo técnico de alguns responsáveis pelos resultados dos exames.

Preenchendo essas lacunas surgiu o *clipping*, com valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos altos (WEINBERG et al, 2003; JUNG et al, 2015; KARIMZADEGAN-NIA et al, 2007; HAGHANI et al, 2013). Por se tratar de um exame microscópico do fungo em parasitismo (ou seja, visualizado no seu meio de contaminação), é possível a análise de outros detalhes e há riqueza de informações sobre a interação entre agente e hospedeiro.

Esse estudo é inédito por não se limitar em verificar a presença ou ausência de estruturas fúngicas e sim por descrever aspectos das alterações ungueais e da morfologia dos fungos nos casos de onicomicose investigados pelo *clipping*, auxiliando dermatologistas, patologistas, micologistas, clínicos e pesquisadores a compreender, analisar e melhor interpretar esse exame.

Apesar de consagrado, ainda há uma vasta área de aprofundamento e estudo do *clipping* para diagnóstico, seguimento e avaliação de onicomicose e esse estudo vem preencher os espaços em aberto na sua utilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS

Fungos são seres sem clorofila, portanto necessitam nutrir-se através de matéria orgânica, da decomposição de organismos ou ainda através de outros organismos vivos. Quando um fungo parasita outro ser vivo, causando-lhe qualquer enfermidade, passa a ser um patógeno (ARENAS, 2014).

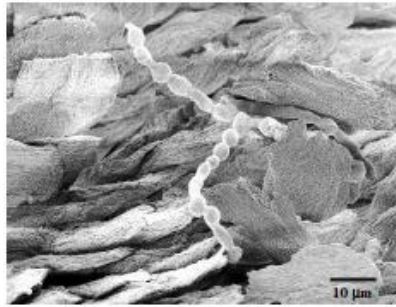
Segundo Arenas (2014), a estrutura dos fungos é formada pelo micélio, representado por hifas, leveduras ou pseudohifas. As hifas são formas miceliares longitudinais com parede celular rígida, de diâmetro variando de 1 a 30 μm . Os fungos superiores são septados e os inferiores são cenocíticos ou não septados. Em estudos de microscopia, as hifas de *T. rubrum* presentes em unhas apresentam 1 a 2 μm , dupla parede celular e septos (YUE et al, 2015).

Há variações nas hifas que podem auxiliar na diferenciação dos fungos:

Dilatações ou vesículas, órgãos de resistência ou clamidosporos, órgãos de fixação ou rizoides, hifas em espiral, órgãos nodulares ou em nós, hifas em raquete, candelabros fávicos ou hifas com ramificações na extremidade, hifas pectinadas ou em pente, hifas peridiaais ou ensacadas e hifas acumuladas ou esclerócio. (Arenas, 2014, p. 19)

Outra característica que ajuda na definição das espécies de fungos é a forma de reprodução, principalmente a assexuada. Nos fungos superiores, a reprodução ocorre por conidiogênese, que pode ser blástica, ocorrendo gemulação como nas leveduras, ou tálica, como nos fungos filamentosos. A artrosporção é uma modalidade de conidiogênese tálica muito comum nos dermatófitos. (ARENAS, 2014). Scherer e Scherer (2004) visualizaram por microscopia eletrônica de varredura a presença de artrosporação, com formação de esporos e segmentos produzidos por septos fragmentados, em uma unha infectada por *T. rubrum* (Figura 1).

FIGURA 1 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA ARTROSPORAÇÃO (1400X).



FONTE: Scherer; Scherer, 2014, p. 361.

Fungos podem causar diversas doenças nos seres humanos, como micetismo, micotoxicose, fenômenos alérgicos e infecções. As infecções são causadas pelos fungos microscópicos e são chamadas de micoses (ZAITZ et al, 2010; ARENAS, 2014).

As micoses são classificadas clinicamente em quatro grandes grupos: superficiais, subcutâneas, sistêmicas e oportunistas. As superficiais ocorrem geralmente por contato direto do fungo com o paciente e afetam pele, anexos e mucosas. Dentre as micoses superficiais, estão as micoses cutâneas, que incluem a candidíase superficial, as dermatofitoses (causadas por fungos com afinidade pela queratina), as dermatomicoses (causadas por não-dermatófitos) e as onicomicoses (infecções fúngicas das unhas) (ARENAS, 2014).

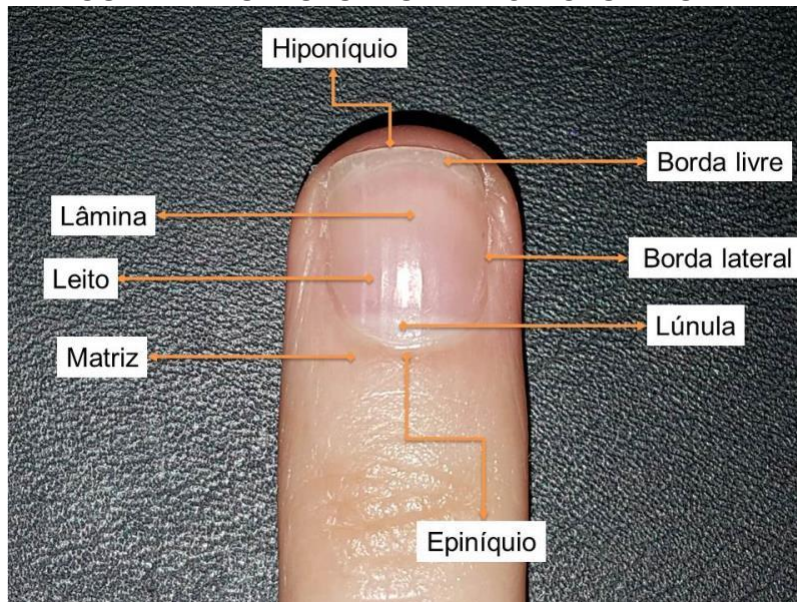
2.2 ONICOMICOSE

Podendo ser denominada de tínea das unhas ou *tinea ungueum*, quando causada por dermatófitos, a onicomicose é uma micose superficial cutânea nas unhas. Acomete até 14% da população (GHANNOUM et al, 2000), sendo mais frequente em idosos.

A infecção geralmente ocorre por contato com solo, vestiários e banheiros (CRISSEY et al, 1995¹, citado por SCHERER; SCHERER, 2004). A inoculação da unha pode ocorrer por disseminação do fungo pela pele invadindo a unha pelo hiponíquio (Figura 2), por invasão direta pela superfície da lâmina ungueal, pela penetração dos fungos na matriz pela borda proximal (TOSTI, 2014) ou por disseminação sistêmica vascular ou linfática (MORENO-COUTINHO et al, 2009). Segundo DeBerker et al² (1995, citado por SCHERER; SCHERER, 2004), os dermatófitos infectam a região ventral da unha penetrando as camadas de queratina através de processos mecânicos e enzimáticos.

Um dos fatores de risco para onicomicose é herança autossômica dominante com padrão familiar para infecção pelo *T. rubrum* (FAERGEMANN; BARAN, 2003). Fatores de risco independentes são diabetes, AIDS e doença arterial periférica (RIBEIRO et al, 2015). O estilo de vida pode ter influência na tendência a micose ungueal, principalmente em nadadores ou pacientes com exposição à com umidade.

FIGURA 2 – ESTRUTURAS ANATÔMICAS DA UNHA.



FONTE: o autor (2016).

¹ CRISSEY, J.T.; LANG, H. PARISH, L.C. Manual of Medical Mycology, p 581, Blackwell Science, Cambridge, England, 1995.

² DEBERKER, D.A.R.; BARAN, R.; DAWHER, R.P.R. Infections involving the nail unit. In Handbook of Diseases of the nails and their management, vol 1, p 53, Blackwell Science, Oxford, England, 1995.

2.2.1 Agentes etiológicos

Conforme um estudo brasileiro de 2015, os principais agentes causadores são os dermatófitos, responsáveis por quase 70% dos casos. Em segundo lugar está a *Candida*, responsável por mais de 27%, e em terceiro, os fungos não dermatófitos, com 2,2% dos casos. Associação entre agentes foi vista em 1,5% (RIBEIRO et al, 2015).

Entre os dermatófitos, o mais encontrado é o *T. rubrum*, mas também são vistos o *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. soudanense* e *T. violaceum*. Entre os não-dermatófitos, são comuns os gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Scytalidium* (ARENAS, 2014).

2.2.2 Clínica

A onicomicose é normalmente assintomática, apresentando-se no início do quadro com alterações apenas do aspecto da unha. Geralmente há onicólise, queratose subungueal, alteração da coloração indo do branco-amarelado até o acastanhado (melanoníquia), onicorrexe e onicodistrofia (GOETTMANN-BONVALLOT, 2003). Alguns casos podem progredir e causar desconforto, dor, parestesia e comprometimento nas atividades diárias.

A apresentação clínica depende principalmente da forma de contaminação. Pode ser subungueal distal-lateral, subungueal proximal, branca superficial, *endonyx*, distrófica total, associada com paroníquia, mista e secundária a outras enfermidades (Figura 3) (GUPTA, 2001; GOETTMANN-BONVALLOT, 2003).

Conforme Goettmann-Bonvallot (2003), a forma clínica mais comum é a onicomicose subungueal disto-lateral, geralmente causada por *T. rubrum*. A forma subungueal proximal da onicomicose também é mais causada pelo *T. rubrum*, mas predomina em pacientes imunossuprimidos. A onicomicose branca superficial é devida principalmente ao *Trichophyton interdigitale* e raramente à *Candida*. A forma clínica de *endonyx* ocorre quando o patógeno invade toda a espessura da unha, sem causar hiperqueratose, sendo frequentemente envolvido o *Trichophyton*

violaceum ou *soudanense*. A onicomicose distrófica total comumente é a progressão da subungueal disto-lateral, passando do seu aspecto clássico para hiperqueratose subungueal amarelada e friável associada a estrias longitudinais, áreas de leuconíquia e onicólise, acometendo toda a unha até a borda proximal. A onicomicose associada com paroníquia é frequentemente causada pelos *Scytalidium* spp.

FIGURA 3 – A. ONICOMICOSE SUBUNGUEAL DISTAL-LATERAL. B. ONICOMICOSE BRANCA SUPERFICIAL. C. ONICOMICOSE DISTRÓFICA TOTAL. D. ONICOMICOSE COM PARONÍQUIA.



FONTE: o autor (2016).

A Tabela 1 esquematiza a apresentação clínica e os principais agentes casuadores segundo outro autor mexicano.

TABELA 1 – APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DA ONICOMICOSE E SEUS PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS

Apresentação clínica	Agentes etiológicos
Subungueal disto-lateral	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>Acremonium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.
Subungueal proximal	<i>T. rubrum</i> ou <i>Candida</i> spp. + Imunossupressão
Branca superficial	<i>Candida</i> spp., <i>T. rubrum</i>

Endonyx	<i>T. soudanense</i> , <i>T. violaceum</i>
Distrófica total	<i>T. rubrum</i>
Paroníquia	<i>Candida</i> spp., <i>Scytalidium</i> spp.
Melanoníquia	<i>T. rubrum</i> , <i>Candida</i> spp., <i>Scytalidium</i> spp.

FONTE: Arenas, 2014, p. 81-82.

NOTA: T. - *Trichophyton*. spp. – espécies.

2.2.3 Tratamento

O tratamento sistêmico da onicomicose com terbinafina 250 mg diário apresenta a maior chance de cura, seguido do itraconazol em esquema de pulso. Outras opções são o fluconazol via oral na dose de 150 a 450 mg semanal e medicamentos tópicos como ciclopirox 8% em esmalte, almorofina 5% em esmalte, terbinafina em solução. Os tratamentos mais recentes são o tavaborole 5% em solução e o efinaconazol 10% em solução (GUPTA; DAIGLE; FOLY, 2015).

Além dos tratamentos medicamentosos, é importante o tratamento de comorbidades que predisponham à onicomicose. Mudanças nos hábitos de vida como manter os pés secos, ventilar os calçados, uso de luvas para atividades com água e terra, atenção em áreas coletivas para banho e piscinas, manicure e pedicure com materiais descartáveis, podem ser de grande auxílio. Terapêuticas adjuvantes como avulsão química e física de unhas muito espessas, iontoforese e tecnologias de luz (laser e terapia fotodinâmica) podem auxiliar no processo de cura da onicomicose (SCHER et al, 2015; GUPTA; SIMPSON; HELLER, 2016).

2.3 DIAGNÓSTICO DAS ONICOMICOSSES

Os métodos mais empregados para diagnóstico de onicomicoses são o exame micológico direto, a cultura para fungos e estudo microscópico ou *clipping*. Há outras opções como clorazol black, *calcoflúor white*, ou ácido periódico de Schiff (PAS – *periodic acid Schiff*) modificado; microcultivo em lâmina; lâmpada de Wood; testes biológicos e bioquímicos; inoculação em animais; microscopia confocal; citometria de fluxo; intradermorreação; sorologias; reação em cadeia da polimerase

(PCR – *protein chain reaction*); hibridização; análise de cariótipo; e vários outros métodos de biologia molecular (CHAUVIN, 2005; ZAITZ et al, 2010; ARENAS, 2014; HAJAR et al, 2016).

2.3.1 Exame micológico direto

A coleta do material ungueal deve ser feita de acordo com o tipo de infecção e na maior quantidade possível, através da curetagem de escamas e fragmentos ungueais, preferencialmente na área de expansão da infecção, percebida por ser a zona de transição entre a unha sadia e doente (ZAITZ et al, 2010).

O material coletado pode ser processado a fresco, em soro fisiológico, com soluções de lugol, de potassa, de DMSO, com lactofenol de Amann, com azul de lactofenol ou de metileno, com sulfito de sódio, ou ainda pode ser corado com nanquim, Gram, Leishmann (ZAITZ et al, 2010; ARENAS, 2014).

Após a coleta e processamento, o material é analisado em microscópio com lente de aumento média e aumento gradativo conforme necessidade de busca por detalhes. O diâmetro dos fungos no exame micológico direto varia de 2 a 20 µm de diâmetro (ARENAS, 2014).

Coletas inadequadas com pouco material, má técnica na busca microscópica e o viés do examinador podem ser causas de resultados falso-negativos (HASSAB-EL-NABY et al, 2011).

2.3.2 Cultura de fungos

É o exame definitivo na elucidação do agente etiológico, porém sua sensibilidade é muito baixa, chegando a 44% a média de falsos negativos (GOMEZ-MOYANO et al, 2014).

As amostras coletadas para cultura de fungos são armazenadas em frasco estéril seco ou com soro fisiológico e semeadas nos meios de cultura tão logo seja possível, usualmente em tubos de ensaio ou em placas de Petri. Os meios de cultura semeados são conservados geralmente em temperatura ambiente (em torno

de 25°C). Dermatófitos desenvolvem-se em uma a quatro semanas, em temperaturas entre 26 e 30°C. Leveduras desenvolvem-se em um ou dois dias e contaminantes em dois a quatro dias (ARENAS, 2014).

Os meios de cultura para fungos mais utilizados são o ágar-Sabouraud-dextrose a 20% (peptona de soja, dextrose, ágar bacteriológico) e o Mycosel® (peptona de soja, glicose, ágar bacteriológico, cloranfenicol, cicloheximida e água destilada em pH 6,9).

Para que a infecção da unha seja considerada causada por um fungo não-dermatófito, há necessidade de que o agente seja isolado em cultura no mínimo em duas amostras diferentes e em ao menos uma das amostras o exame micológico direto precisa mostrar hifas (SUMMERBELL et al, 2005).

a) Macrocultura

Permite a diferenciação entre fungos filamentosos e leveduriformes. São analisados tamanho, forma, cor do verso e do reverso das colônias, difusão do pigmento, coloração, textura, superfície, aspecto, consistência e a velocidade de crescimento (ARENAS, 2014).

b) Microcultura ou cultura em lâmina

É um método mais preciso para observar as estruturas fúngicas microscopicamente.

Pelo método descrito por Zaitz (2010), uma lâmina de vidro é depositada dentro de uma placa de Petri, sobre um bastão de vidro em formato de U. Acima da lâmina é colocado um fragmento de 1 cm² de ágar-batata. Nesse quadrado, é semeada a amostra coletada de macrocultura desenvolvida e sobre ele, é posta uma lâminula estéril. Após período suficiente de crescimento, a lâminula é retirada e colocada em nova lâmina com lactofenol azul algodão e visualizada ao microscópio (ZAITZ et al, 2010).

São observadas características do micélio (filamentoso ou levedura, órgãos de frutificação dos micélios reprodutivos, espessura, bifurcações, septos, coloração), presença de conídeos e anexos (ARENAS, 2014).

2.3 CLIPPING

Um exame com uso em ascensão no diagnóstico da onicomicose é a microscopia da borda livre, ou *clipping*, corado com PAS. O termo *clipping* é de origem inglesa, derivado do verbo *to clip*, que é traduzido para o Português como “cortar”. Na dermatologia e dermatopatologia, seu uso já está consagrado para denominar a coleta de fragmentos de lâmina ungueal cortados na borda distal e livre que serão submetidos à análise microscópica.

O *clipping* é vantajoso por ter alta sensibilidade, ser de simples execução, resultados são vistos rapidamente, sofre menos influência na coleta, possibilita distinguir morfologicamente grupos de patógenos, determina a localização precisa do patógeno, pode auxiliar na avaliação de tratamentos e pode ser armazenado para revisões futuras (SHENOY et al, 2008).

A coloração mais utilizada na investigação da onicomicose é o ácido periódico de Schiff com digestão (PAS-cd), que demonstra alguns polissacarídeos como glicogênio e mucoproteínas, corando-os em vermelho e assim os fungos aparecem vermelho-vivos. Também são usadas a coloração de hematoxilina-eosina, e a metenamina de prata, ou Gomori-Grocott, que reage com a parede celular de modo que os fungos se coram de negro e o fundo de verde-claro (REZA-KERMANSNAHI; RHATIGAN, 2010; ARENAS, 2014).

Conforme explica Arenas (p. 46, 2014, tradução dos autores), o estudo anatomopatológico da onicomicose a partir de unhas coradas com PAS “é útil para documentar a presença de fungos, com altas sensibilidade e especificidade, sendo considerado o método padrão por demonstrar de maneira absoluta o diagnóstico, principalmente em fungos oportunistas”.

O estudo microscópico é considerado método rápido e que frequentemente resulta no diagnóstico presuntivo ou imediato do fungo e da sua invasão tecidual.

O estudo histopatológico pode fornecer, além do diagnóstico etiológico, informações adicionais sobre interrelações parasita-hospedeiro, tais como nível de invasão dos tecidos, o padrão da resposta tecidual, a atividade do processo, a carga parasitária, a viabilidade dos fungos, etc. (Horta de Lima, CL; Marques, MEA; em ZAITZ, 2010, p. 26)

Sagher, já em 1948, defendeu o uso da avaliação microscópica de unhas coletadas por avulsão cirúrgica de toda a placa em 14 casos de onicomicose. Ele enumerou cinco informações possíveis de serem adquiridas pelo exame histológico das unhas:

1. Pode mostrar a distribuição dos fungos na placa ungueal e o efeito da sua invasão na estrutura da unha.
 2. Pode mostrar que os fungos estão na placa ungueal, confirmando assim o achado microscópico, ou pode mostrar que os fungos estão presentes apenas na área em torno da unha.
 3. Pode revelar fungos no leito ungueal e no material cornificado subungueal.
 4. Pode mostrar se a clínica e os achados histológicos são consistentes.
 5. Pode servir como guia de escolha de tratamento da doença.
- (Sagher, F, 1948, p. 337, tradução dos autores).

Outro estudo que analisou a unha coletada a partir de *clipping* e submetendo-a ao mesmo processamento que é utilizado para o preparo de tecidos (histotecnica), foi publicado em 1991 por Suarez et al. Esses autores utilizaram o *clipping* para coleta do material ungueal, recomendando amostras com pelo menos 3 mm de tamanho. A coloração de PAS na investigação de onicomicose mostrou-se uma alternativa ao exame micológico direto e à cultura, exames que nem sempre produziam índices satisfatórios nos quesitos sensibilidade e rapidez nos resultados.

2.3.1 Processamento

Werner e Antunes, em 2013, avaliaram o processamento das amostras de unha coletadas por *clipping*, comparando o emblocamento em parafina de amostras fixadas em formalina *versus* espécimes a seco e não encontraram diferenças entre as técnicas. Pièrard et al (1994), assim como Fillus e Tchorobay (2009), também relatam boa experiência no armazenamento a seco da amostra, sem necessidade de uso de formol ou outros fixadores.

O maior desafio no preparo das lâminas de *clipping* é o corte da unha no micrótomo, devido à consistência firme e à grande quantidade de queratina do material. Além da opção de cortes do fragmento ungueal diretamente incluído em parafina (PIERARD, 1994; FILLUS; TCHORNOBAY, 2009; WERNER; ANTUNES, 2013), outros métodos para processamento da amostra com o objetivo de amolecer a unha e facilitar o corte no micrótomo são o KOH a 20%, KOH seguido de detergente e amônia, óleo de cedro, ácido tricloroacético a 5% em formalina a 10% ou em Carbowax solúvel em água, a solução aquosa de Tween-40 a 10%, a ureia a 10%, o fenol a 3% ou 4%, o polietileno glico-piraxilina e o metacrilato (HAGHANI et al, 2013; FLECKMAN; OMURA, 2001; SUAREZ, 1991; PIERARD, 1994; HASSAB-EL-NABY et al, 2011; MAGALHÃES; SUCCI; SOUSA, 2003; CHANG et al, 2007).

Alguns estudos processaram apenas a porção subungueal dos *clippings* realizados na investigação de onicomicose subungueal disto-lateral e distrófica total, obtendo bons resultados (CHANG et al, 2007; NAGAR, 2012).

Após processada, a amostra deve ser cuidadosamente cortada em micrótomo e então corada.

2.3.2 Análise

Duas áreas distintas são avaliadas no *clipping*, a placa e a região subungueal (macroscopicamente chamado de hiponíquio), divididas por uma linha virtual denominada zona de transição ungueal. A metade superior da placa traz informações sobre a matriz proximal da unha, enquanto a porção inferior, imediatamente acima da região subungueal, revela alterações decorrentes da matrix distal. A região subungueal demonstra as alterações do leito ungueal. A zona de transição ungueal tem formato mais ondulado nas porções próximas às bordas laterais da unha, diferente do formato mais plano visto no centro dos fragmentos. (WERNER; ANTUNES, 2013).

Já foram descritas várias características das unhas com onicomicose. Em um relato de uma série de casos, com 55 amostras coletadas de 14 pacientes, foram vistos: fungos penetrando a placa ungueal sem causar qualquer reação na unha, formação de aspecto ondulado com projeções profundas da região subungueal com

presença de fungos nas camadas mais profundas, distribuição de fungos em várias regiões da unha com grande distúrbio das camadas, fungos torcidos com áreas estreita e dilatadas, ramificações, cadeias de hifas localizadas em regiões de paraceratose subungueal, fendas profundas, algumas com hifas as penetrando, hifas segmentadas, agrupamento de esporos (SAGHER, 1948).

Além da presença de hifas também já foram descritos hiperqueratose subungueal extensa, paraqueratose, hemorragia, lagos serosos e infiltrado neutrofílico perivascular na derme em 14 biópsias de unhas (leito e placa) com onicomomicose (GROVER; REDDY; CHATURVEDI, 2003).

Jerasutus³ (2005 citado por FILLUS; TCHORNOBAY, 2009) descreve como alterações que podem ser encontradas na análise microscópica da onicomomicose a paraceratose, lagos serosos, corpos citoides, fungos (incluindo hifas, pseudo-hifas, blastoconídeos), pigmento, sangue, bactérias, ácaros e corpos estranhos.

Mayer, Izhak e Bergman (2012) descreveram como achados significativos no *clipping* da onicomomicose paraceratose e lagos serosos. Sem diferença estatística, mas em maior quantidade do que em unhas sem fungos, esses autores também viram maior presença de neutrófilos e de bactérias.

Dentre as características na análise microscópica de unhas especificamente contaminadas com *T. rubrum*, estão descritos o acometimento de camadas mais profundas; hifas grossas, ramificadas, segmentadas e principalmente agrupadas no centro da unha; poucos esporos na placa, mas que podem formar massas na região subungueal; grande distúrbio da estrutura da unha; e fendas causadas provavelmente pela invasão dos fungos. Já dentre as características vistas na infecção por *T. violaceum* está descrita a presença de poucas e longas hifas e esporos, geralmente superficiais e quase sem alterar a estrutura ungueal (SAGHER, 1948). Também há menção da presença de hifas finas e de artroconídeos em alguns casos, porém sem agente causador confirmado (JILLSON; PIPER, 1957).

Na onicomomicose distrófica total, a invasão miceliana ocorre em toda a espessura da placa ungueal. Na onicomomicose causada por dermatófitos, as hifas

³ JERASUTUS S. Histology and histopathology. In: Scher RK, Daniel III CR, editors. Nails therapy-diagnosis-surgery. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.37-51.

vistas foram regulares, septadas e de cor rosa na coloração de PAS. Já nos casos de infecção ungueal por leveduras, são encontrados blastoconídeos esféricos agrupados e por vezes com ramificações e pseudo-hifas ou curtos filamentos. Por fim, quando o casuador é um fungo não dermatófito, os filamentos são geralmente espessos, rugosos, com septos irregulares e ramificados. Conídeos grandes, roxos e com dupla parede celular são vistos nos casos de *Arpergillus* spp. e conídeos pequenos em formato de limão nos casos de *Scopulariopsis brevicaulis* (GIANNI et al, 2001).

2.3.3 Validade diagnóstica do *clipping*

A partir de 1991, o *clipping* se consolidou como método altamente eficiente e eficaz, com altos valores de sensibilidade e predição negativa (HAGHANI et al, 2013). A sua sensibilidade varia de 41 a 100%, enquanto a sua especificidade varia de 3,8 a 80,8% (Tabela 2).

Em um estudo de 2011, o *clipping* alcançou 82% de sensibilidade, seguido da cultura com 53% e do exame direto, com 48% (WILSMANN-THEIS et al, 2011). Quando são associados métodos de exame direto com o *clipping*, chega-se a 97,8% de sensibilidade, com um valor preditivo negativo de 98% (KARIMZADEGAN-NIA et al, 2007).

Vários outros estudos compararam sensibilidade, especificidade e valores preditivos do método diagnóstico do *clipping*. Em 2003, um grupo de pesquisa utilizou como padrão-ouro o método de exame micológico direto com calcofluor *white*, conhecido por ter os maiores valores de sensibilidade e especificidade na pesquisa de micoses superficiais. Nesse estudo, as sensibilidades encontradas foram de 92% para o *clipping*, 80% para o exame micológico direto e 59% para cultura. As especificidades foram de 72% para *clipping*, 72% para exame micológico direto e 82% para cultura. Os valores preditivos negativos foram de 77% para *clipping*, 58% para exame micológico direto e 43% para cultura. Já os valores preditivos positivos foram de 89% para exame micológico direto, 88% para cultura e 90% para *clipping* (WEINBERG et al, 2003).

Nessa mesma linha, um estudo coreano de 2015 apresentou sensibilidade de 49,5% para cultura e de 93,1% para *clipping* (JUNG et al, 2015). Já a combinação do *clipping* com cultura mostra sensibilidade de 80,3 a 94,1%, significativamente mais sensível que o exame micológico direto com cultura (JUNG et al, 2015; ALKHAYAT et al, 2009).

A taxa de sensibilidade do *clipping* é maior quando há crescimento de dermatófitos na cultura, atingindo 92,9%, contra 23,3% nos casos com crescimento de fungos não-dermatófitos, conforme visto num estudo observacional com 104 pacientes (ALKHAYAT et al, 2009). Nesse estudo, as culturas positivas (58 casos) foram divididas em dois grupos, dermatófitos (28 casos) e não-dermatófitos (30 casos) e os resultados do *clipping* foram então comparados entre os grupos.

Dentre as validações de teste diagnóstico, o *clipping* mostrou-se o método isolado mais sensível em 12 de 14 estudos (Tabela 2). Os dados detalhados dos diferentes estudos de *clipping* na onicomicose podem ser melhor visualizados no Anexo 2.

Autor (ano)	Teste	Sens.	VPN	Espec.	VPP
Lawry (2000)	<i>Clipping</i>	85,0	70,0		
	EMD+PAS	57,0	44,0		
	EMD-CB	53,0	42,0		
	EMD-CW	53,0	42,0		
	Cultura	32,0	33,0		
	MCD	23,0	31,0		
Weinberg (2003)	<i>Clipping</i>	92,0	77,0	72,0	89,7
	EMD	80,0	58,0	72,0	88,0
	Cultura	59,0	43,0	82,0	90,0
Reisberger (2003)	<i>Clipping</i>	41,6			
	EMD	35,6			
	Cultura	22,8			
Lilly (2006)	<i>Clipping</i>	98,8			
	EMD-CB	94,3			
	EMD derm	90,9			
	EMD lab	87,8			
	EMD-DMSO	79,5			
	Cultura	79,3			
	MCD	57,3			
Hsiao (2006)	EMD	87,0	50,0		
	<i>Clipping</i>	81,0	40,0		
	Cultura	67,0	28,0		
Karimzegadan (2007)	<i>Clipping</i> + EMD	97,8	98,0		
	<i>Clipping</i> + cultura	95,6	94,2		
	<i>Clipping</i>	80,8	84,5		

Conclusão					
	EMD + cultura	78,8	85,0		
	EMD	76,5	81,6		
	Cultura	55,2	69,0		
Alkhatat (2009)	<i>Clipping</i> + cultura	80,3		100,0	
	<i>Clipping</i>	60,9	71,3	80,3	72,7
Wilsmann-Theis (2011)	<i>Clipping</i> + cultura	96,0			
	<i>Clipping</i> + EMD	89,0			
	<i>Clipping</i>	82,0	81,0		
	EMD + cultura	74,0			
	Cultura	53,0	63,0		
	EMD	48,0	61,0		
Hassab-el-Naby (2011)	EMD	75,0			
	<i>Clipping</i>	57,5			
Haghani (2013)	<i>Clipping</i>	100,0	100,0	3,8	75,0
	EMD-CW	96,0	66,0	23,0	78,0
	EMD	93,0	66,0	38,0	81,0
Jung, grupo A (2015)	<i>Clipping</i>	93,1	82,2		
	Cultura	49,5	63,4		
Jung, grupo B (2015)	<i>Clipping</i> + cultura	94,1			
	<i>Clipping</i>	88,2			
	<i>Clipping</i> + EMD	72,1			
	EMD	55,9			
	Cultura	29,4			
Blake (2015)	<i>Clipping</i>	78,7		54,1	
	EMD	63,8		78,7	
Hajar (2016)	<i>Clipping</i>	92,5		55,5	
	EMD	75,0		72,0	

FONTE: PubMed.

NOTAS: Senc. – Sensibilidade. VPN – Valor preditivo negativo. Espec. – Especificidade. VPP – Valor preditivo positivo. EMD – Exame micológico direto. EMD-CB – Exame micológico direto com Clorazol Black. EMD-CW – Exame micológico direto com Calcofluor-White. EMD-PAS – Exame micológico direto com Ácido Periódico de Schiff. MCD – Meio de cultura para dermatófitos. EMD-derm – Exame micológico direto realizado por dermatologista. EMD-lab – Exame micológico direto realizado por técnico de laboratório.

Quanto ao custo-benefício dos testes diagnósticos, uma avaliação realizada em 2006 mostrou equivalência na sensibilidade do *clipping* e do exame micológico direto com *chlorazol black*. O exame micológico direto foi considerado o menos dispendioso e o *clipping* o mais (LILLY et al, 2006). Em outra avaliação sobre o tempo necessário para cada resultado, o exame micológico direto levou em média 30 minutos, o *clipping* três a quatro dias e a cultura três a seis semanas (JUNG et al, 2015).

Outras utilidades do *clipping* incluem pesquisa de hematoma subungueal, melanoníquia, cosmética ungueal e usos em medicina forense (STEPHEN; TOSTI; RUBIN, 2015). Além disso, Fillus Neto e Tchernobay (2009) citam a utilidade desse exame na investigação de líquen plano, psoríase ungueal, traumas, discromias e até mesmo tumores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Foi elaborado um estudo observacional e descritivo de casos de onicomicose analisados pelo método de *clipping* corado com PAS no período de setembro de 2014 a fevereiro de 2015.

Foram utilizadas as dependências do ambulatório de dermatologia do Hospital de Clínicas da UFPR, no serviço de atendimento ambulatorial 4 (SAM 4), para exame e seleção dos pacientes, assim como para coleta dos dados e do material. O processamento histológico foi realizado em laboratório de patologia terceirizado e a análise das lâminas foi feita no laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. Os exames microscópicos diretos e os cultivos foram feitos no laboratório de micologia da Unidade de Apoio Diagnóstico (UAD) do Hospital de Clínicas da UFPR.

O estudo teve aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa em seres humanos – CEP do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sob número de registro CAAE 36620114.7.0000.0096 (Anexo 1). Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

3.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram obedecidos os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

3.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com idade acima de 18 anos, de ambos os gêneros, atendidos no serviço de dermatologia que apresentassem queixas ungueais

específicas ou que o quadro ungueal fosse achado de exame físico durante consultas por outras queixas;

- Ter capacidade de ler e entender o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE);
- Concordar em participar do estudo e assinar o TCLE;
- Ter diagnóstico clínico e dermatoscópico de onicomicose em pelo menos uma das unhas das mãos ou dos pés;
- Não ter sido submetido a tratamentos antifúngicos tópicos nas unhas ou sistêmicos para quaisquer micoses nos últimos três meses;
- Ter possibilidade de retornar para coleta de informações e do material.

3.2.2 Critérios de exclusão

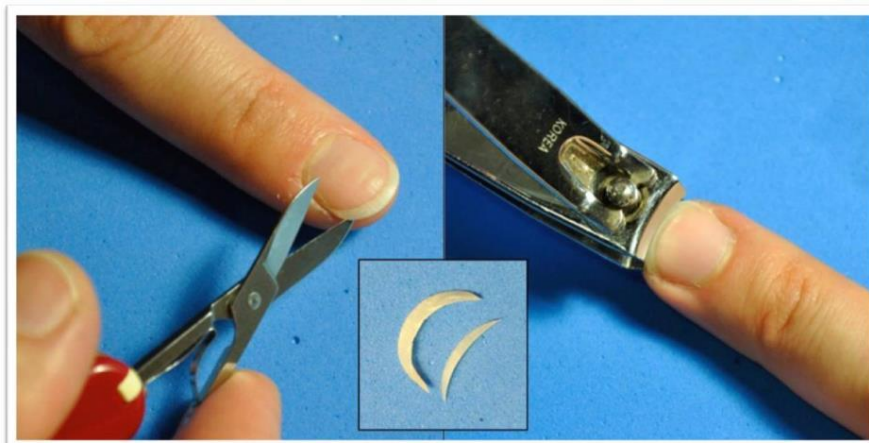
- Iniciar uso de medicamentos antissépticos ou antifúngicos tópicos nas unhas ou uso de antifúngicos sistêmicos para outros tratamentos após a inclusão no estudo e antes de realizadas as coletas;
- Desistir ou deixar de permitir que seus dados sejam utilizados no estudo;
- Ausência de estruturas fúngicas na análise do *clipping*.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

A coleta das amostras de unha foi feita por *clipping* realizado por médico dermatologista treinado (Figura 4-A). O *clipping* foi feito através do corte de um fragmento com no mínimo 2X5 mm da borda livre da unha acometida, o mais proximal possível e tentando incluir a porção subungueal, realizado com cortador de unha comum, lavado e submetido à assepsia com álcool 70º entre cada caso. O fragmento foi transportado em pacote plástico seco e vazio, de 3X5 cm e com fecho hermético, identificado com o nome do paciente, idade e unha coletada (Figura 4). Em no máximo sete dias da coleta, cada amostra foi encaminhada até o laboratório

de patologia terceirizado (Laboratório Byori), responsável pela inclusão em bloco de parafina, cortes e colorações.

FIGURA 4 – FRAGMENTO DE UNHA COLETADO POR MEIO DE *CLIPPING*. A. COLETA COM TESOURA DELICADA. B. COLETA COM CORTADOR DE UNHA.

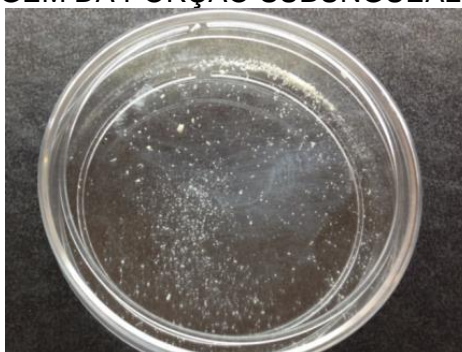


FONTE: cortesia dra. Betina Werner.

No mesmo dia da realização do *clipping* e pelo mesmo médico, foi coletado, em placa de Petri esteril de sete centímetros de diâmetro (Figura 5), material para exame micológico direto e culturas por meio de curetagem subungueal com cureta óssea de Bruns número 00. O local de coleta foi o mais próximo possível da transição da unha sã para a região comprometida. O material curetado foi devidamente identificado e encaminhado no mesmo dia para o laboratório de micologia para processamento.

Em 16 casos, as amostras foram coletadas na sequência de curetagem seguida do *clipping*. Nos demais, o *clipping* foi realizado previamente à curetagem.

FIGURA 5 – MATERIAL COLETADO EM PLACA DE PÉTRI ESTÉRIL POR MEIO DE CURETAGEM DA PORÇÃO SUBUNGUEAL DA UNHA



FONTE: o autor (2016).

3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.4.1 Exame micológico direto

O material curetado foi encaminhado para o Laboratório de Micologia da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas. Metade do material disposto na placa de Petri foi colocada em uma lâmina corretamente identificada, adicionado duas a três gotas de hidróxido de potássio a 40% e recoberto por lâminula. Após 10 a 15 minutos, foi feita a busca em todos os campos por microscopia óptica com objetiva de 100 e de 400x por um biólogo micologista experiente. Todas as amostras nas quais foram encontradas estruturas fúngicas foram assinaladas como positivas e registradas conforme as denominações usuais de hifas septadas hialinas, hifas demáceas, artroconídeos, esporos e células leveduriformes.

3.4.2 Culturas

A outra metade do material curetado foi semeada em tubos de ensaio com meios de cultura de ágar dextrose Sabouraud com cloranfenicol (peptona de soja, dextrose, ágar bacteriológico e cloranfenicol) e de Mycosel® (peptona de soja, glicose, ágar bacteriológico, cloranfenicol, cicloheximida e água destilada em pH 6,9). Os tubos foram mantidos em estufa à temperatura de 30°C e semanalmente verificados. Após seis semanas do cultivo, o resultado foi registrado.

As técnicas de identificação dos fungos foram realizadas conforme os critérios macro e micromorfológicos descritos em Lacaz et al (1991) (ANEXO 3). Nas culturas positivas foi feita a observação macroscópica e de microcultivo, com análise da micromorfologia da conidiogênese, permitindo a identificação de fungos dermatófitos, não-dermatófitos e leveduras. Nos casos de crescimento de fungos não-dermatófitos, nova curetagem e cultivo foram realizados e considerados positivos somente se o resultado se repetiu, conforme método analisado por Summerbell em 2005.

3.4.3 *Clippings*

O processamento das amostras foi realizado conforme descrito por Werner e Antunes, 2013. De acordo com a técnica descrita por eles, as amostras armazenadas em frascos secos são imersas em parafina derretida a 68°C por 50 minutos. Para os cortes no micrótomo, os blocos parafinados são direcionados de maneira que o eixo longitudinal do fragmento de unha fique a 90° com a lâmina de corte. A face de corte dos blocos fica em contato com uma superfície a 1°C de temperatura, com 10% de solução de hidróxido de amônio, por 30 minutos previamente à microtomia. Os blocos de parafina são então seccionados com 2 µm e depositados em lâminas de Meyer recobertas com albumina. Os cortes são então corados e avaliados microscopicamente.

3.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS *CLIPPINGS*

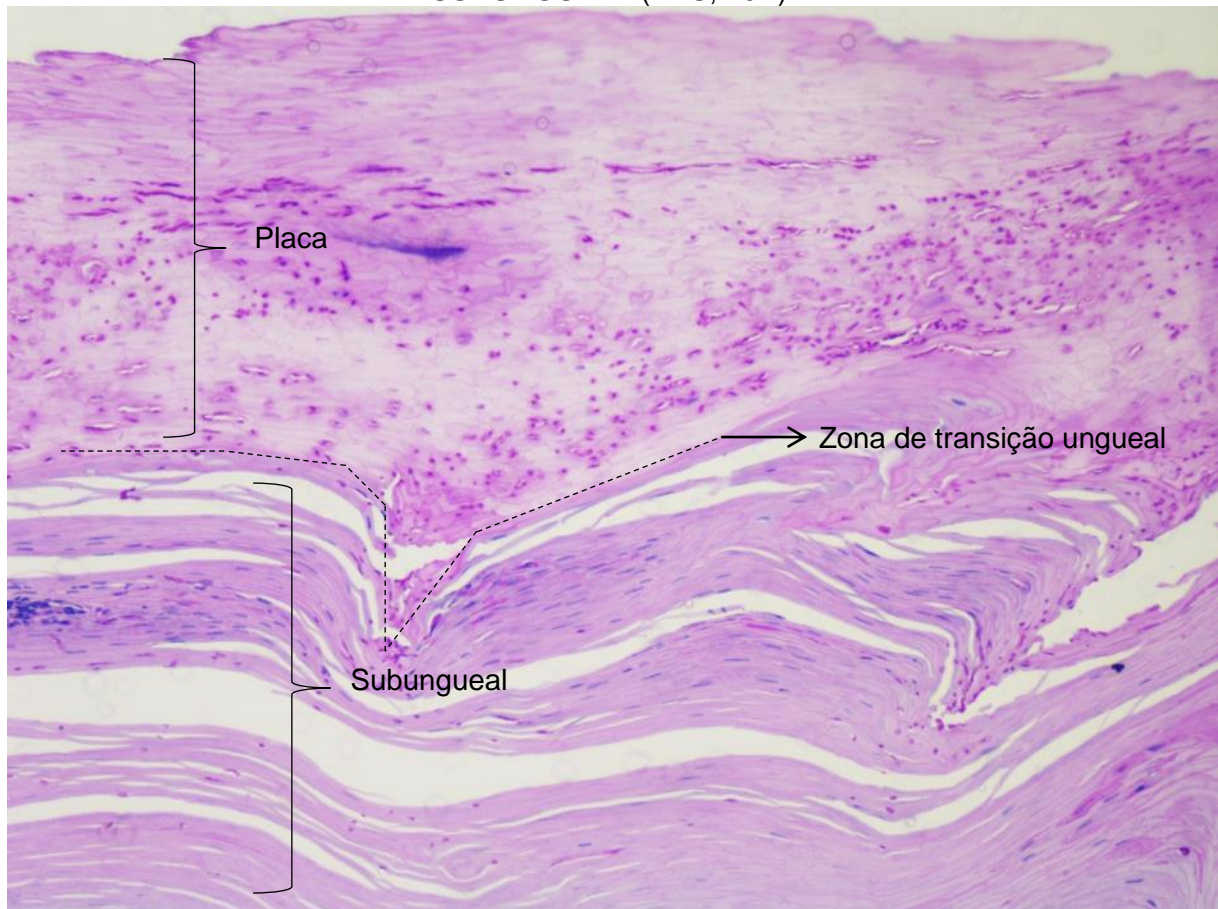
A autora, após treinamento para análise do *clipping* e com cegamento dos resultados das culturas, analisou cada lâmina em todos os seus cortes, em três ocasiões distintas, duas em conjunto com dermatopatologista experiente em microscopia ungueal. A análise foi dividida em duas etapas: análise da unha propriamente dita e análise das estruturas fúngicas.

Após a análise de todas as amostras, os resultados das culturas foram abertos para verificação e comparados com os critérios avaliados.

3.5.1 Análise da unha

A unha é dividida em duas regiões distintas, a placa e a região subungueal, separadas por uma linha chamada de zona de transição ungueal (Figura 6). Foram avaliados critérios descritivos de cada uma dessas regiões.

FIGURA 6 – DIVISÕES DA UNHA: PLACA, ZONA DE TRANSIÇÃO UNGUEAL E REGIÃO SUBUNGUEAL (PAS, 20X).



FONTE: o autor (2016).

a) Placa

- Espessura da placa (Figura 7): medida em milímetros entre a superfície da unha até o ponto mais alto da zona de transição ungueal. As medidas de espessura da placa foram possíveis apenas nos espécimes idealmente orientados no processo de corte dos fragmentos parafinizados;
- Fendas (Figura 8): presença de alterações do tipo fissuras, frestas ou cisuras dentro da superfície da placa;
- Onicocariose (Figura 9): presença de núcleos de onicócitos visíveis na placa;
- Paraceratose granular (Figura 10): presença de granulações no interior do citoplasma de onicócitos.

b) Zona de transição ungueal

- Definição: se nítida (Figura 11-A), quando claramente visível, ou se borrada (Figura 11-B), quando a transição era pouco ou não perceptível;
- Linearidade: caracterizada em regular ou irregular (Figura 12).

c) Região subungueal

- Espessura da camada subungueal (Figura 13): medida em milímetros do ponto mais alto da zona de transição ungueal até a última camada de células da porção subungueal. As medidas de espessura da região subungueal foram possíveis apenas nos espécimes idealmente coletados e orientados no processo de corte dos fragmentos parafinizados;
- Lagos serosos (Figura 14): presença de coleções de soro na região subungueal;
- Neutrófilos (Figura 15);
- Número de camadas de paraceratose (Figura 16): número de camadas de células da região subungueal, contadas por base na visualização de seus núcleos. Esse critério foi aferido sempre na região com maior número de camadas.

3.5.2 Análise das estruturas fúngicas

As estruturas fúngicas foram avaliadas quanto à distribuição e quanto à morfologia.

a) Distribuição

- Quantidade: mensurada em pouco, moderado e muito, sendo que foi avaliado o corte com maior densidade de estruturas fúngicas em campo de grande aumento;
- Localização: na placa, na região subungueal ou em ambas.

b) Morfologia

- Leveduriformes: quando identificadas estruturas leveduriformes (Figura 17), foi investigado se eram agrupadas ou isoladas e se havia a presença de brotamentos (Figura 18);
- Hifas: quando identificadas hifas, foram verificadas as presenças de septos (Figura 19), de artrosporação (Figura 20), de ramificações (Figura 21) e de dimorfismo (Figura 22). Foi considerado dimorfismo quando havia ao menos uma hifa com formato irregular com dilatações e tortuosidades, fugindo da forma convencional linear. As hifas também foram avaliadas quanto à espessura como grossas ou finas.

3.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram digitalizados em tabela Excel™ (Versão 14.0.6023.1000, Microsoft Office Professional Plus 2010, © 2010 Microsoft Corporation, Santa Rosa, CA) e analisados através do software Epi Info™ (Versão 7.1.5.0, Centers for Disease Control, Atlanta, GA). As imagens foram tomadas com câmera iSight de 8 megapixels (iPhone 5, Apple Inc., Cupertino, CA) e as imagens dermatoscópicas com DermLite II Hybrid M (3Gen Inc, San Juan Capistrano, CA).

Inicialmente, realizou-se uma análise descritiva do conjunto de dados. Para as variáveis quantitativas, foram calculadas medidas estatísticas de média, variância e desvio padrão. Para as variáveis categóricas foram construídas tabelas de frequência e contingência.

Para as análises de distribuição, foram aplicados testes não paramétricos. Quando a variável critério era categórica aplicou-se o teste Qui-quadrado. Se houve alguma célula com valor menor de cinco, então se aplicou o teste de Fisher. Quando a variável era contínua, aplicou-se o teste de Mann-Whitney.

Em todos os testes, aplicou-se o nível de significância de $\leq 5\%$.

4 RESULTADOS

4.1 PANORAMA GERAL

Cento e cinco amostras foram coletadas de 55 pacientes. Dessas, uma foi excluída por negação de assinatura do TCLE, duas amostras foram excluídas por escassez de material e 40 por não apresentarem presença de estruturas fúngicas no *clipping*, sendo que dessas, dezesseis tiveram a curetagem antes do *clipping*, o que prejudicou a análise. Assim, um *n* de 62 amostras coletadas de 31 pacientes foi estudado.

Dos 31 pacientes selecionados, 74,19% (23) eram mulheres e 25,81% (8) eram homens. As idades variaram de 29 a 81 anos, com média de 55,55 anos (desvio-padrão (DP) $\pm 10,97$), sem diferença estatística entre os gêneros.

Dentre as 62 amostras analisadas, 58,06% (36) foram coletadas de unhas com onicomicose subungueal disto-lateral, 40,32% (25) com onicomicose distrófica total e apenas 1,61% (um caso) com onicomicose branca superficial. Outras apresentações clínicas não foram vistas. O hálux foi o dedo mais frequentemente acometido, correspondendo a 56,45% das amostras. Apenas 6,45% (4) das amostras foram coletadas de dedos das mãos, todas dos polegares. Em relação ao tempo de evolução, a média foi de 5,1 anos (DP $\pm 3,90$).

Das amostras incluídas no estudo, 62,90% (39) tiveram positividade no exame micológico direto e 35,48% (22) tiveram positividade nas culturas para fungos, sendo 29,03% (18) culturas filamentosas e 6,45% (4) leveduriformes. Das 18 culturas filamentosas, 83,33% (15) foram identificadas como *T. rubrum* e 16,67% (3) como *Aspergillus* spp. Das leveduriformes, todas foram identificadas como *Candida* sp.

4.2 ANÁLISE DA UNHA

4.2.1 Placa

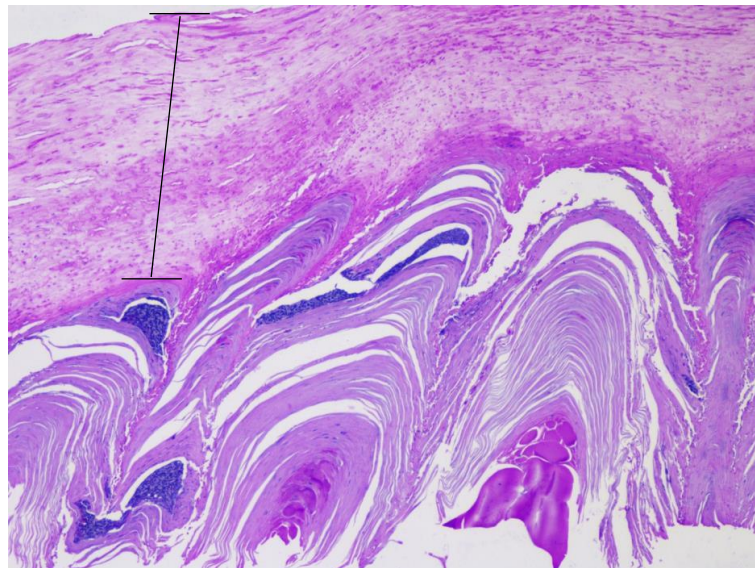
Todas as amostras foram avaliadas para os critérios da placa, porém a medida da espessura da placa pode ser corretamente aferida em 33 amostras. As culturas das amostras avaliadas foram quinze de *T. rubrum*, três de *Aspergillus* spp., quatro de *Candida* spp. e 40 negativas.

a) Espessura da placa em milímetros

Nos casos nos quais a espessura da placa pode ser medida (33), a média foi de 0,5867 milímetros (de 0,3900 a 1,3000 mm, variância (Var) 0,0698, DP $\pm 0,2641$, mediana (Med) 0,5200 e moda 0,3500).

Nas amostras com desenvolvimento de *T. rubrum*, a média de espessura da placa foi de 0,5 mm (Var 0,0255, DP $\pm 0,1597$), nas com *Candida* spp. de 0,3567 mm (Var 0,0044, DP $\pm 0,067$), na com desenvolvimento de *Aspergillus* spp. a medida foi de 0,5 mm e nas amostras com culturas negativas, 0,6430 mm (Var 0,0823, DP $\pm 0,2869$).

FIGURA 7 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA PLACA: ESPESSURA DA PLACA. (PAS, 10X)



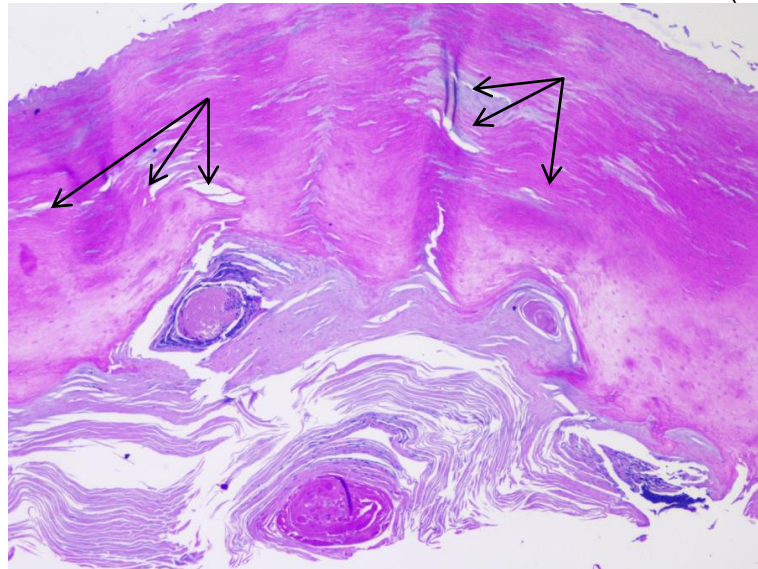
FONTE: o autor (2016).

b) Fendas

Foram vistas em 38 de 62 amostras (61,29%).

Nos casos com desenvolvimento de *T. rubrum*, fendas estiveram presentes em oito das 15 amostras (53,33%), em duas das quatro amostras com *Candida* spp. (50%), em três de três amostras com desenvolvimento de *Aspergillus* spp. (100%) e em 25 de 40 amostras negativas (62,50%).

FIGURA 8 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA PLACA: FENDAS. (PAS, 10X)



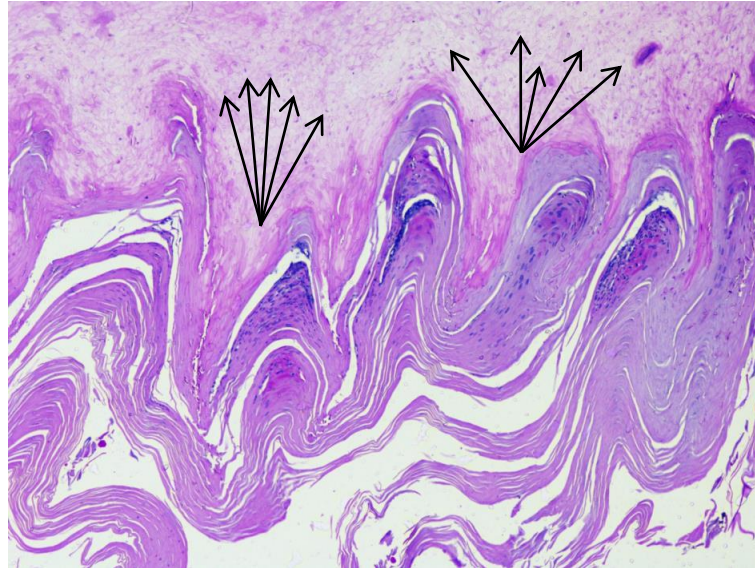
FONTE: o autor (2016).

c) Onicocariose

Onicocariose foi vista em 32 amostras (51,61%).

Nas amostras com desenvolvimento de *T. rubrum*, onicocariose esteve presente em cinco de 15 amostras (33,33%), nas com *Candida* spp. em três de quatro (75%), nas com desenvolvimento de *Aspergillus* spp. em uma de três (33,33%) e nas negativas em 23 de 40 amostras (57,50%).

FIGURA 9 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA PLACA: ONICOCARIOSE. (PAS, 10X)



FONTE: o autor (2016).

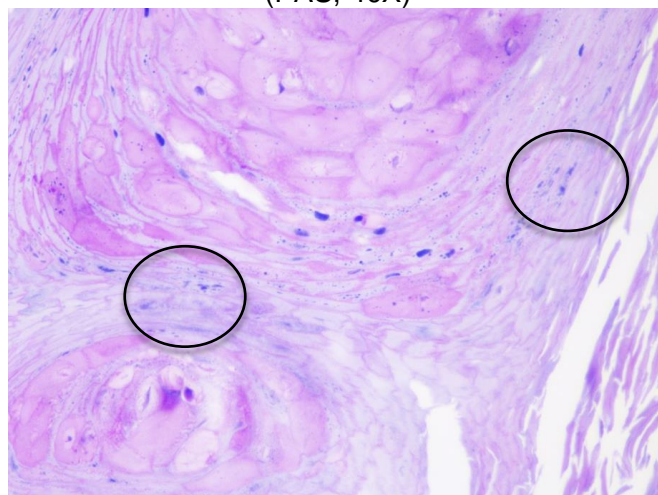
d) Paraceratose granular

Paraceratose granular foi vista em 25 das 62 amostras (40,32%).

Nas amostras com desenvolvimento de *T. rubrum*, paraceratose granular esteve presente em dois de 15 casos (13,33%), nas com *Candida* spp. em um de quatro (25%), nas com desenvolvimento de *Aspergillus* spp. em um de três (33,33%) e nas negativas em 21 de 40 (52,50%).

Das 25 amostras com paraceratose granular, vinte e uma (84%) não tiveram crescimento de fungos na cultura. Já dentre 22 amostras com cultura positiva, apenas quatro (18,18%) apresentaram paraceratose granular.

FIGURA 10 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA PLACA: PARACERATOSE GRANULAR. (PAS, 40X)



FONTE: o autor (2016).

4.2.2 Zona de transição ungueal

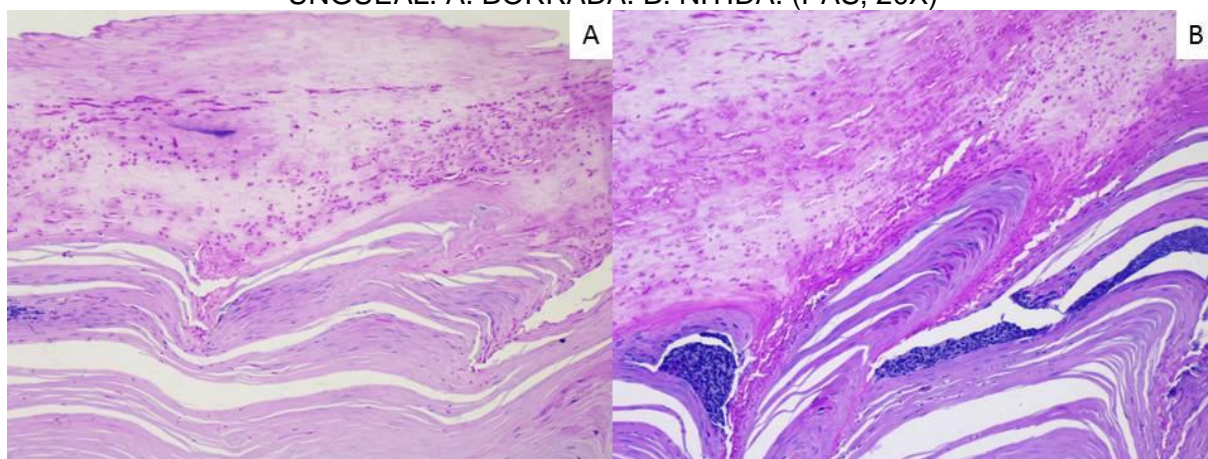
Em 38 amostras foi possível avaliar a zona de transição ungueal. Dessas, onze tiveram culturas positivas sendo oito para *T. rubrum* e três para *Aspergillus* spp.

a) Nitidez da zona de transição ungueal

Em 29 das 38 amostras (76,32%), a zona de transição ungueal estava borradas e em 9 (23,68%), nítida.

Nas oito amostras com *T. rubrum*, a nitidez da zona de transição ungueal estava borrada em cinco (62,50%) e nítida em três (37,50%). Em todos os três casos em que houve crescimento de *Aspergillus* spp. estava borrada. A nitidez da zona de transição ungueal não pode ser definida em nenhum dos casos com crescimento de *Candida* spp.

FIGURA 11 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA DEFINIÇÃO DA ZONA DE TRANSIÇÃO UNGUEAL. A. BORRADA. B. NÍTIDA. (PAS, 20X)



FONTE: o autor (2016).

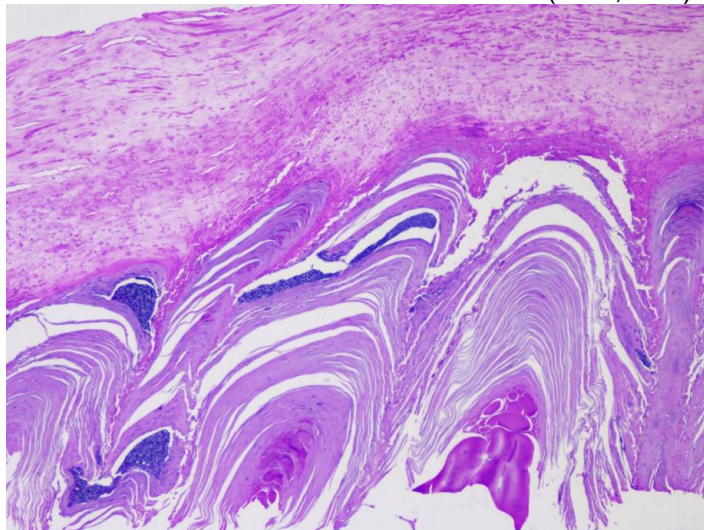
b) Formato da linha da zona de transição ungueal

Em 36 das 38 amostras (94,74%), a zona de transição ungueal foi definida como irregular e em apenas duas (5,26%) como regular.

Nas oito amostras com desenvolvimento de *T. rubrum*, a linha da zona de transição ungueal era irregular em sete (87,50%) e regular em uma (12,50%). Em todos os três casos em que houve crescimento de *Aspergillus* spp., era irregular. O

formato da linha da zona de transição ungueal não pode ser definida em nenhum dos casos com crescimento de *Candida* spp.

FIGURA 12 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA LINEARIDADE DA ZONA DE TRANSIÇÃO UNGUEAL: ARQUEADA IRREGULAR. (PAS, 10X)



FONTE: o autor (2016).

4.2.3 Análise da camada subungueal

Devido à interferência da curetagem prévia ao *clipping* em algumas coletas, houve amostras que não puderam ser avaliadas para todos os critérios da região subungueal. A medida da espessura da placa pode ser corretamente aferida em 23 amostras. A presença de lagos serosos, neutrófilos e bactérias foi avaliada em 54 amostras e o número de camadas de paraceratose em 53. As culturas das amostras avaliadas foram quinze de *T. rubrum*, três de *Aspergillus* spp., duas de *Candida* spp. e 40 negativas.

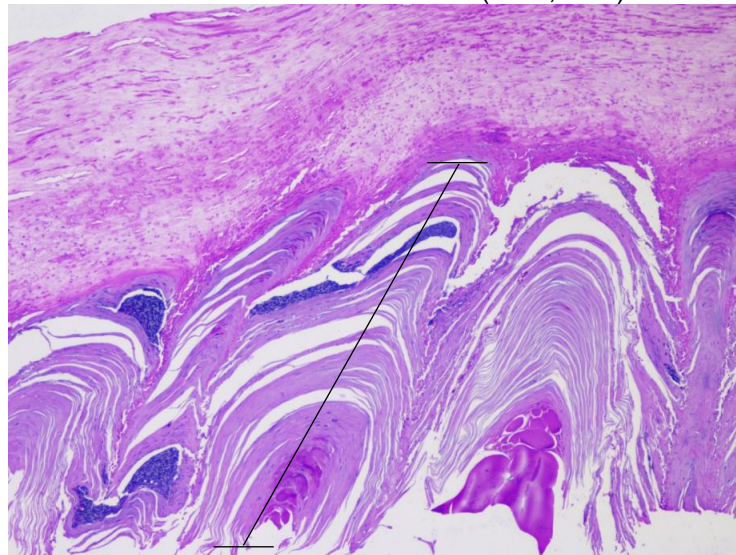
a) Espessura da camada subungueal em milímetros

Nas 23 amostras em que foi medida a espessura da camada subungueal, a média foi de 0,5361 mm (de 0,2000 a 1,200 mm, Var 0,0942, DP $\pm 0,3069$, Med 0,500 e moda 0,2000).

Nas amostras com desenvolvimento de *T. rubrum*, a média de espessura da região subungueal foi de 0,4267 mm (Var 0,0237, DP $\pm 0,1536$) e nas com cultura

negativa, a média foi de 0,5746 mm (Var 0,116, DP $\pm 0,3406$). Nenhuma das amostras com desenvolvimento de *Aspergillus* spp. e de *Candida* spp. teve possibilidade de aferição da espessura subungueal.

FIGURA 13 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: ESPESSURA DA CAMADA SUBUNGUEAL. (PAS, 10X)



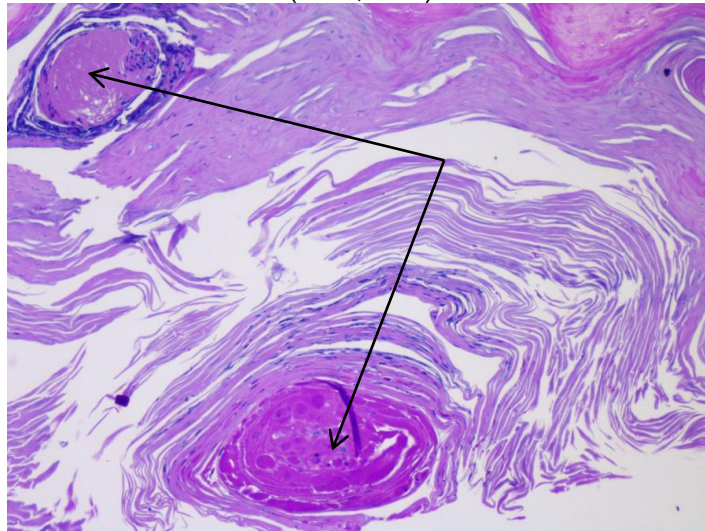
FONTE: o autor (2016).

b) Lagos serosos

Lagos serosos estavam presentes em 35 das 54 amostras analisadas (64,81%).

Nas 15 amostras com desenvolvimento de *T. rubrum*, lagos serosos estavam presentes em cinco (33,33%), nas três com desenvolvimento de *Aspergillus* spp. em duas (66,67%) e nas 34 amostras com culturas negativas em 28 (82,35%). Nas duas amostras com crescimento de *Candida* spp., não foram vistos lagos serosos.

FIGURA 14 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: LAGOS SEROSOS.
(PAS, 20X)



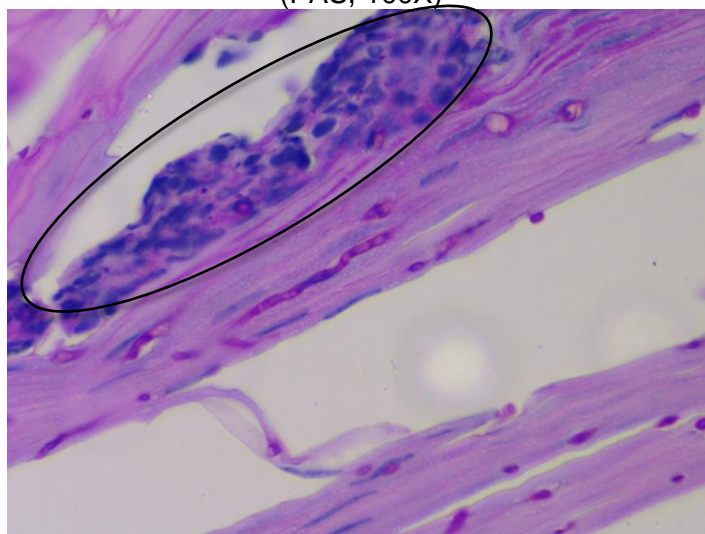
FONTE: o autor (2016).

c) Neutrófilos

Neutrófilos estavam presentes em 22 das 54 amostras avaliadas (40,74%).

Nas quinze amostras com desenvolvimento de *T. rubrum*, neutrófilos estavam presentes em apenas três (20%), nas três com desenvolvimento de *Aspergillus* spp. estavam presentes em duas (66,67%) e nas 34 com cultura negativa em 15 (50%). Todos os dois casos com crescimento de leveduras apresentaram ausência de neutrófilos no *clipping*.

FIGURA 15 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: NEUTRÓFILOS.
(PAS, 100X)



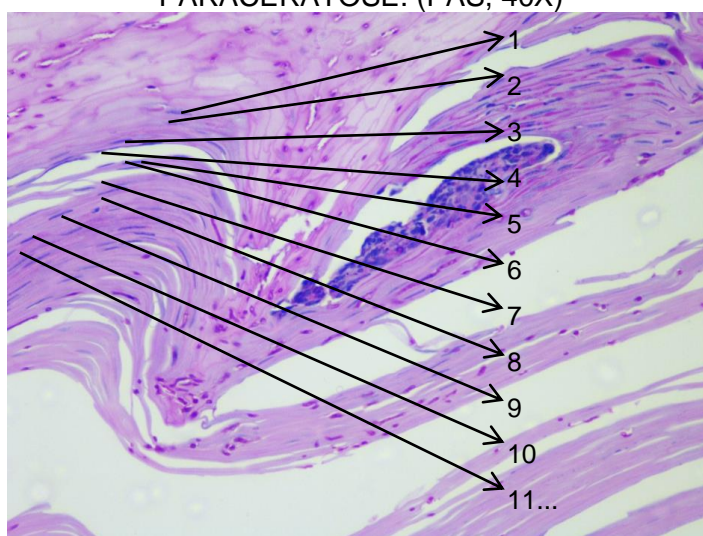
FONTE: o autor (2016).

d) Número de camadas de paraceratose subungueal

O número de camadas de paraceratose foi contado em 53 amostras. A média foi de 10,7925 camadas (de 0,0000 a 44,0000, Var 139,0522, DP $\pm 11,7920$, Med 6,0000, moda 1,0000).

Das quinze amostras que apresentaram crescimento de *T. rubrum* na cultura, a média foi de 11 camadas de paraceratose subungueal (Var 166,8571, DP $\pm 12,9173$) contadas no *clipping*. As três amostras com desenvolvimento de *Aspergillus* spp. tiveram média de sete camadas (Var 43, DP $\pm 6,5574$) e as 33 com cultura negativa, 11,7 (Var 140,7803, DP $\pm 11,8651$). Nas amostras que tiveram crescimento de *Candida* spp. na cultura, nenhuma camada de paraceratose foi contada.

FIGURA 16 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: CAMADAS DE PARACERATOSE. (PAS, 40X)



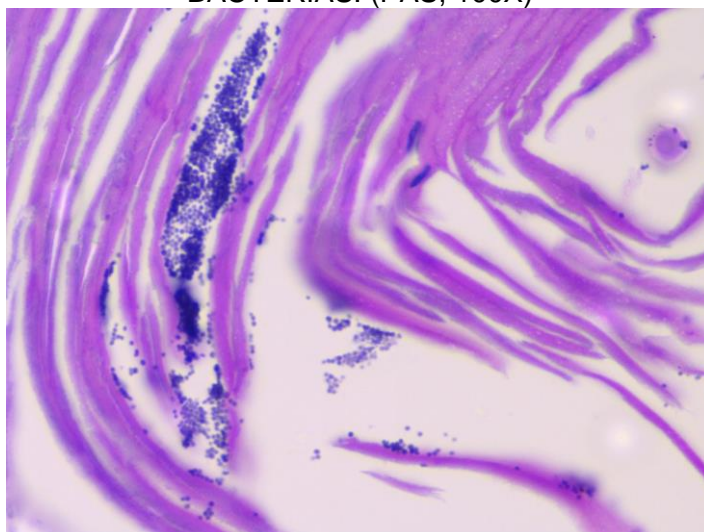
FONTE: o autor (2016).

e) Bactérias

Foram vistas em 18 de 54 amostras (33,33%).

Nas quinze amostras com desenvolvimento de *T. rubrum*, bactérias estiveram presentes em quatro (26,67%), em uma das duas com crescimento de *Candida* spp. (50%) e em 13 das 34 com cultura negativa (38,24%). Nas amostras com crescimento de *Aspergillus* spp. não foram vistas bactérias.

FIGURA 17 – CRITÉRIOS ANALISADOS NA REGIÃO SUBUNGUEAL: PRESENÇA DE BACTÉRIAS. (PAS, 100X)



FONTE: o autor (2016).

4.3 FUNGOS

Das 62 amostras analisadas pelo *clipping*, quarenta (64,52%) tiveram resultado negativo e 22 (35,48%), positivo nas culturas. Das 22 culturas positivas, dezoito (29,03%) tiveram desenvolvimento de fungos filamentosos (quinze *T. rubrum* e três *Aspergillus* spp.) e quatro (6,45%) de leveduras.

4.3.1 Distribuição

a) Localização

A localização dos fungos mais visualizada nos *clippings* foi na região subungueal, sendo que em 53 das 62 amostras (85,48%) havia fungos na região subungueal e na placa. Em nove casos analisados (14,52%) foram vistos fungos apenas na placa.

Em oito dos 15 dos casos com crescimento de *T. rubrum* (53,33%), fungos foram vistos tanto na placa quanto na região subungueal, assim como em todos os três casos com crescimento de *Aspergillus* spp. Em dois dos quatro casos com crescimento de *Candida* spp., a presença de fungos foi vista apenas na placa (50%).

Em 17 de 34 amostras (42,50%) com cultura negativas havia fungos em toda a espessura da unha e em seis (15%), apenas na placa.

b) Quantidade

Em 28 das 62 amostras (45,16%) houve poucos fungos no *clipping*. Em 19 casos (30,65%) havia quantidade moderada e em 15 (24,19%), muitos fungos.

Em sete dos 15 casos (46,67%) com crescimento de *T. rubrum*, havia poucos de fungos, já em 100% dos casos com *Aspergillus* spp. houve quantidade moderada. Em três dos quatro casos (75%) com *Candida* spp. houve poucos fungos. Já dentre os 34 casos com cultura negativa, havia pouca quantidade de fungos em 18 (45%) e moderada em 11 (27,50%).

4.3.2 Morfologia

a) Estruturas leveduriformes

Estruturas leveduriformes foram vistas em nove das 62 amostras (14,52%). Estruturas leveduriformes foram vistas nos quatro casos (100%) com crescimento de *Candida* spp. na cultura e em três dos 15 casos (20%) com *T. rubrum*. Dentre os 40 casos com culturas negativas, dois (5%) apresentavam estruturas leveduriformes no *clipping*.

• Agrupamento

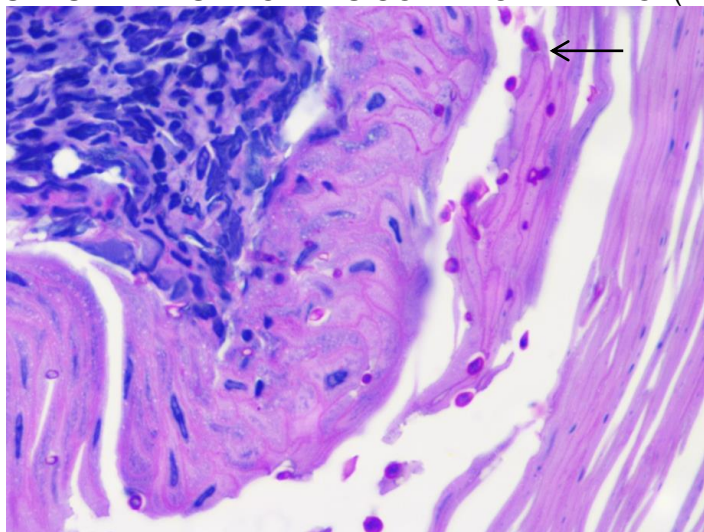
As estruturas leveduriformes distribuíram-se de maneira agrupada em oito dos nove casos (88,89%) e de maneira isolada em apenas um (11,11%).

Dentre os nove casos com estruturas leveduriformes, quatro apresentaram *Candida* spp. na cultura, sendo que em três (75%) elas estavam agrupadas. Três casos apresentaram *T. rubrum* e dois tiveram resultado negativo na cultura, todos com estruturas leveduriformes distribuídas de maneira agrupada.

• Brotamento

A visualização de estruturas similares a brotamentos ocorreu em três dos nove casos com estruturas leveduriformes. Nesses três casos houve crescimento de *T. rubrum* nas culturas. Nos quatro casos com *Candida* spp. e nos dois casos com cultura negativa, não havia brotamentos.

FIGURA 18 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO *CLIPPING*: ESTRUTURAS LEVEDURIFORMES COM BROTAMENTO. (PAS, 100X)



FONTE: o autor (2016).

b) Hifas

A presença de hifas foi verificada em 56 (90,32%) das 62 amostras analisadas.

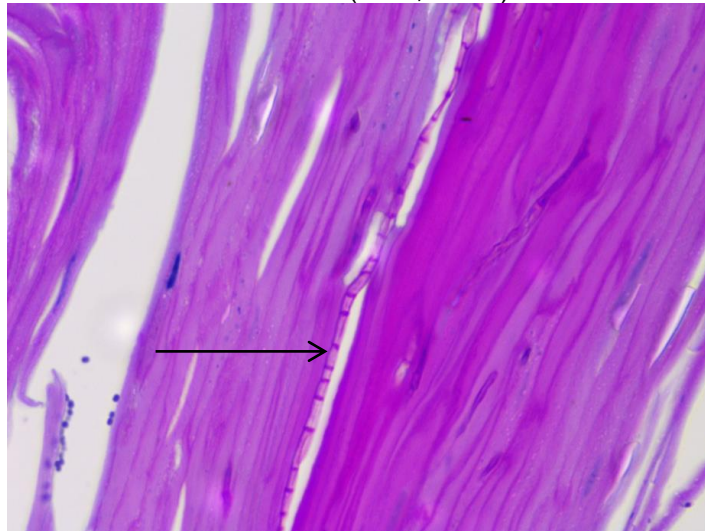
Das 56 amostras com hifas, dezoito (81,82%) tiveram resultados positivos nas culturas, sendo 17 filamentosas. Dos quinze casos com desenvolvimento de *T. rubrum*, quatorze (93,33%) apresentavam hifas, dos três com *Aspergillus* spp., todos (100%) apresentavam e dos quatro com *Candida* spp., um (25%) apresentava. Dos 40 casos com amostras negativas, trinta e oito (95%) tinham hifas.

• Septos

Septos estavam presentes em 54 das 56 (96,43%) das amostras com hifas. Em todos os casos com hifas e culturas positivas foi verificada a presença de septos.

Dos quatorze casos com hifas e desenvolvimento com *T. rubrum*, todos apresentavam septos, assim como nos três casos com *Aspergillus* spp. No caso que tinha hifa e crescimento de *Candida* spp. na cultura também havia septação. Das trinta e oito amostras com hifas e que tiveram cultura negativa, trinta e seis (94,74%) apresentavam septos.

FIGURA 19 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO *CLIPPING*: SEPTOS. (PAS, 100X)



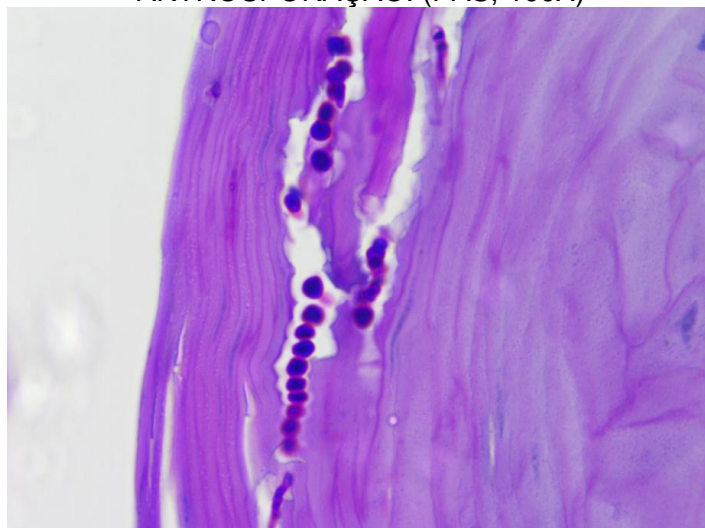
FONTE: o autor (2016).

- Artrosporação

Artrosporação foi vista em 24 dos 56 casos com hifas (42,86%), sendo que em sete (38,89%) houve positividade nas culturas.

Dos quatorze casos com hifas e crescimento de *T. rubrum*, seis (42,86%) apresentavam artrosporação. Em apenas um dos três casos (33,33%) com hifas e *Aspergillus* spp. e no único caso avaliado com crescimento de *Cândida* spp. não havia artrosporação. Das 38 amostras com hifas e culturas negativas, dezessete (44,74%) tinham artrosporação.

FIGURA 20 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO *CLIPPING*: ARTROSPORAÇÃO. (PAS, 100X)



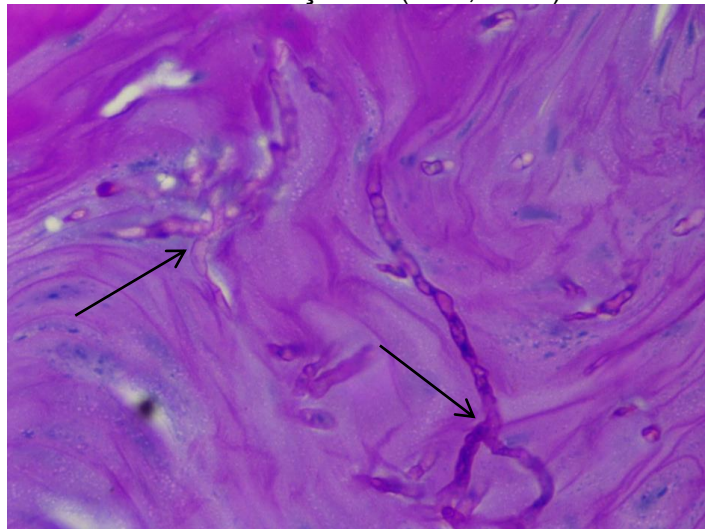
FONTE: o autor (2016).

- Ramificações

Ramificações foram vistas em 15 das 56 amostras com hifas (26,79%). Dessas 15, oito (44,44%) tiveram culturas positivas.

Dos 15 casos com crescimento de *T. rubrum*, seis (42,85%) apresentavam ramificações. Doi dos três (66,67%) com crescimento de *Aspergillus* spp. também apresentavam. O único caso com hifa e crescimento de *Candida* spp. na cultura não apresentou ramificações. Já das 38 amostras com hifas e culturas negativas, apenas sete (18,42%) tinham.

FIGURA 21 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO *CLIPPING*: RAMIFICAÇÕES. (PAS, 100X)



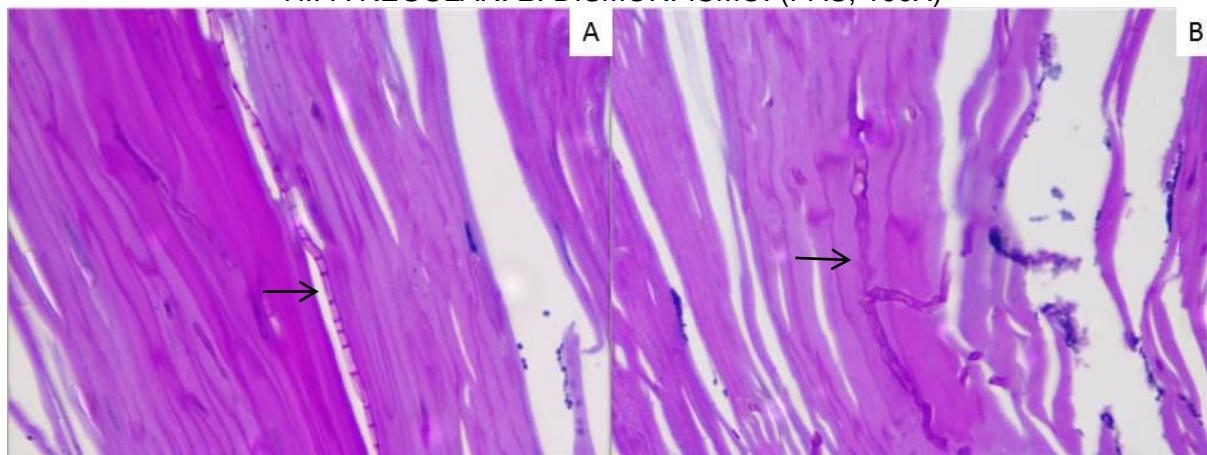
FONTE: o autor (2016).

- Dismorfismo

Dismorfismo foi visto em 29 das 56 amostras (51,79%).

Dos 15 casos com crescimento de *T. rubrum*, seis (42,85%) apresentavam dismorfismo, dos três casos com *Aspergillus* spp., todos apresentavam e das 38 amostras com hifas e culturas negativas, 20 (52,63%). O caso avaliado com hifa e crescimento de *Candida* spp. não apresentou dismorfismo.

FIGURA 22 – MORFOLOGIA ESTUDADA NA PRESENÇA DE FUNGOS NO *CLIPPING*: A. HIFA REGULAR. B. DISMORFISMO. (PAS, 100X)



FONTE: o autor (2016).

- Espessura

O mais encontrado foi presença de hifas grossas, com 33 dos 56 casos com hifas (58,93%). Hifas finas foram vistas em 11 (19,64%) e a combinação de hifas finas e grossas foi vista em 12 casos (21,43%).

Dos 15 casos com crescimento de *T. rubrum*, quatro (28,57%) apresentavam hifas finas, cinco (35,71%) hifas grossas e cinco (35,71%), associação de hifas finas e grossas. Todos os três casos com crescimento de *Aspergillus* spp. apresentavam hifas grossas. O único caso com crescimento de *Candida* spp. e presença de hifas teve espessura fina. Dos 38 casos com hifas e culturas negativas, seis (15,79%) tiveram hifas finas, vinte e cinco (65,79%) hifas grossas e sete (18,42%), associação de hifas finas e grossas.

Os resultados estão compilados nas tabelas 3 e 4. As tabelas 5, 6 e 7 mostram os valores de *p* nas comparações entre os grupos de resultados de culturas.

TABELA 3 – MÉDIAS E PORCENTAGEM EM RELAÇÃO À PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS CRITÉRIOS, ENTRE AS CULTURAS POSITIVAS, NEGATIVAS E O TOTAL.

Critérios			Positivas		Negativas		Total		
			N	Médias e %	N	Médias e %	N	Médias e %	
PLACA	Espessura da placa (mm)	méd	10	0,4570	23	0,6430	33	0,5867	
	Fendas	+	13	59,09	25	62,50	38	61,29	
		-	9	40,91	15	37,50	24	38,71	
	Onicocariose	+	9	40,91	23	57,50	32	51,61	
		-	13	59,09	17	42,50	30	48,39	
	Paraceratose granular	+	4	18,18	21	52,50	25	40,32	
-		18	81,82	19	47,50	37	59,68		
ZTU	Nitidez	B	8	72,63	21	77,78	29	76,32	
		N	3	27,27	6	22,22	9	23,68	
	Linha	IR	10	90,91	26	96,30	36	94,74	
		REG	1	9,09	1	3,70	2	5,26	
SUBUNGUEAL	Espessura subungueal (mm)	méd	6	0,4267	17	0,5747	23	0,5361	
	Lagos serosos	+	7	35,00	28	82,35	35	64,81	
		-	13	65,00	6	17,65	19	35,19	
	Neutrófilos	+	5	25,00	17	50,00	22	40,74	
		-	15	75,00	17	50,00	32	59,26	
	Camadas paraceratose	méd	20	9,3000	33	11,6970	53	10,7925	
	Bactérias	+	5	25,00	13	38,24	18	33,33	
		-	15	75,00	21	61,76	36	66,67	
FUNGOS	Fungos	+	22	100,00	40	100,00	62	100,00	
		-*	-	-	-	-	-		
	Dist.	Localização	PI	3	13,64	6	15,00	9	14,52
			S	7	31,82	17	42,50	24	38,71
			P+S	12	54,55	17	42,50	29	46,77
		Quantidade	M	4	18,18	11	27,50	15	24,19
			MOD	8	36,36	11	27,50	19	30,65
			Po	10	45,45	18	45,00	28	45,16
	Morfologia	Leveduras	+	7	31,82	2	5,00	9	14,52
			-	15	68,18	38	95,00	53	85,48
		Agrupamento	A	6	85,71	2	100,00	8	88,89
			I	1	14,29	0	0,00	1	11,11
		Brotamento	+	3	42,86	0	0,00	3	33,33
			-	4	57,14	2	100,00	6	66,67
		Hifas	+	18	81,82	38	95,00	56	90,32
			-	4	18,18	2	5,00	6	9,68
		Septos	+	18	100,00	36	94,74	54	96,43
			-	0	0,00	2	5,26	2	3,57
		Artrosporação	+	7	38,89	17	44,74	24	42,86
			-	11	61,11	21	55,26	32	57,14
		Ramificação	+	8	44,44	7	18,42	15	26,79
			-	10	55,56	31	81,58	41	73,21
		Dismorfismo	+	9	50,00	20	52,63	29	51,79
			-	9	50,00	18	47,37	27	48,21
		Espessura	F	5	27,78	6	15,79	11	19,64
			G	8	44,44	25	65,79	33	58,93
			F+G	5	27,78	7	18,42	12	21,43

FONTE: dados do estudo.

NOTAS: mm: milímetros. ZTU: zona de transição ungueal. +: presente. -: ausente. méd: média. B: borrada. N: nítida. IR: irregular. REG: regular. PI: placa. S: subungueal. P+S: placa e subungueal. M: muito. MOD: moderado. Po: pouco. A: agrupado. I: isolado. Dist.: distribuição.

TABELA 4 – MÉDIAS DE ESPESSURA DA PLACA, DE ESPESSURA SUBUNGUEAL E DE CAMADAS DE PARACERATOSE, E NÚMERO DE CASOS EM RELAÇÃO À AUSÊNCIA E A PRESENÇA DOS CRITÉRIOS, PARA CADA RESULTADO DE CULTURA. Continua

Critérios			<i>Trichophyton rubrum</i>		<i>Aspergillus spp</i>		<i>Candida spp.</i>		Negativas		Total	
			N	% ou média	N	% ou média	N	% ou média	N	% ou média	N	% ou média
PLACA	Número total de casos		15	100,00	3	100,00	4	100,00	40	100,00	62	100,00
	Espessura da placa	mm	15	0,5	1	0,5	4	0,3567	23	0,6430	33	0,5867
	Fendas	+	8	53,33	3	100,00	2	50,00	25	62,50	39	61,29
		-	7	47,67	0	0,00	2	50,00	15	37,50	21	38,71
	Onicocariose	+	5	33,33	1	33,33	3	75,00	23	57,50	32	51,61
		-	10	66,67	2	66,67	1	25,00	17	42,50	28	48,39
	Paraceratose granular	+	2	18,33	1	33,33	1	35,00	21	52,50	36	40,32
		-	13	86,67	2	66,67	3	75,00	19	47,50	25	59,68
ZTU	Número total de casos		8	100,00	3	100,00	0	0	27	100,00	11	100,00
	Nitidez	B	5	62,50	3	100,00	0	0,00	21	77,78	29	76,32
		N	3	37,50	0	0,00	0	0,00	6	22,22	9	23,68
	Linha	IR	7	87,50	3	100,00	0	0,00	26	96,30	36	94,74
		REG	1	12,50	0	0,00	0	0,00	1	3,70	2	5,26
SUBUNGUEAL	Número total de casos		15	100,00	3	100,00	4	100,00	34	100,00	62	100,00
	Espessura subungueal	mm	15	0,4267	-	0	-	0	17	0,5747	23	0,5361
	Lagos serosos	+	5	33,33	2	66,67	0	0,00	28	82,35	35	64,81
		-	10	66,67	1	33,33	2	100,00	6	17,65	19	35,19
	Neutrófilos	+	3	20,00	2	66,67	0	0,00	17	50,00	22	40,74
		-	12	80,00	1	33,33	2	100,00	17	50,00	32	59,26
	Camadas paraceratose	Nº	15	11	3	7	2	0	33	11,6970	53	10,7925
	Bactérias	+	4	26,67	0	0,00	1	50,00	13	38,24	18	33,33
		-	11	73,33	3	100,00	1	50,00	21	61,76	37	66,67
FUNGOS	Número total de casos		15	100,00	3	100,00	4	100,00	40	100,00	62	100,00
	Distrib. Localização	PI	1	6,67	0	0,00	2	50,00	6	15,00	9	14,52
		S	6	40,00	0	0,00	1	25,00	17	42,50	24	38,71
		P+S	8	53,33	3	100,00	1	25,00	17	42,50	29	46,77
	Quantidade	M	4	26,67	0	0,00	0	0,00	11	27,50	15	24,19

											Conclusão	
Morfologia		MOD	4	26,67	3	100,00	1	25,00	11	27,50	19	30,65
		Po	7	46,66	0	0,00	3	74,00	18	45,00	28	45,16
	Leveduras	+	3	20,00	0	0,00	4	100,00	2	5,00	9	14,52
		-	12	80,00	3	100,00	0	0,00	38	95,00	53	85,48
	Agrupamento	A	3	100,00	0	0,00	3	75,00	2	100,00	8	88,89
		I	0	0,00	0	0,00	1	25,00	0	0,00	1	11,11
	Brotamento	+	3	100,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	33,33
		-	0	0,00	0	0,00	4	100,00	2	100,00	6	66,67
	Hifas	+	14	93,33	3	100,00	1	25,00	38	95,00	56	90,32
		-	1	6,67	0	0,00	3	75,00	2	5,00	6	9,68
	Septos	+	14	100,00	3	100,00	1	100,00	36	94,74	54	96,43
		-	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	5,26	2	3,57
	Artrosporação	+	6	42,86	1	33,33	0	0,00	17	44,74	24	42,86
		-	8	57,14	2	66,67	1	100,00	21	55,26	32	57,14
	Ramificação	+	6	42,86	2	66,67	0	0,00	7	18,42	15	26,79
		-	8	57,14	1	33,33	1	100,00	31	81,58	41	73,21
	Dismorfismo	+	6	42,86	3	100,00	0	0,00	20	52,63	29	51,79
		-	8	57,14	0	0	1	100,00	18	47,37	27	48,21
	Espessura	F	4	28,57	0	0,00	1	100,00	6	15,79	11	19,64
		G	5	35,71	3	100,00	0	0,00	25	65,79	33	58,93
		F+G	5	35,71	0	0,00	0	0,00	7	18,42	12	21,43

FONTE: dados do estudo.

NOTAS: mm: milímetros. ZTU: zona de transição ungueal. +: presente. -: ausente. méd: média B: borrada. N: nítida. IR: irregular. REG: regular. Pl: placa. S: subungueal. P+S: placa e subungueal. M: muito. MOD: moderado. Po: pouco. A: agrupado. I: isolado. Distrib.: distribuição

TABELA 5 – VALORES DE *P* NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DE CULTURAS POSITIVAS E NEGATIVAS.

Critérios		% de presença ou média nas culturas positivas	% de presença ou média nas culturas negativas	<i>p</i>	
Placa	Espessura da placa (mm)	0,4570	0,6430	0,0863	
	Fendas	59,09	62,50	0,7936	
	Onicocariose	40,91	57,50	0,2148	
	Paraceratose granular	18,18	52,50	0,0089	
ZTU	Nitidez borrada	72,73	77,78	0,7431	
	Linha irregular	90,91	96,30	0,5061	
Subungueal	Espessura subungueal (mm)	0,4267	0,5747	0,4310	
	Lagos serosos	35,00	82,35	0,0005	
	Neutrófilos	25,00	50,00	0,0737	
	Camadas paraceratose	9,30	11,70	0,1625	
	Bactérias	25,00	38,24	0,3235	
Fungos	Dist. Localização (P+S)	54,55	42,50	0,3668	
	Dist. Quantidade (pouca)	45,16	45,45	0,9730	
	Morfologia	Leveduras	31,82	5,00	0,0044
		Agrupadas	85,71	100,00	0,5929
		Brotamento	42,86	0,00	0,2850
		Hifas	81,82	95,00	0,0957
		Septos	100,00	94,74	0,3261
		Artrosporação	38,89	44,74	0,6822
		Ramificação	44,44	18,42	0,0418
		Dismorfismo	50,00	52,63	0,8553
		Espessura (finas)	27,78	15,79	0,1328

FONTE: dados do estudo.

NOTAS: mm: milímetros. ZTU: zona de transição ungueal. P+S: placa e subungueal. Dist.: distribuição.

TABELA 6 – VALORES DE *P* NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DE CULTURAS COM *T. RUBRUM* E *ASPERGILLUS* SPP.

Continua

Critérios		% de presença ou média nas culturas com <i>T. rubrum</i>	% de presença ou média nas culturas com <i>Aspergillus</i> spp.	<i>p</i>
Placa	Espessura da placa (mm)	0,5000	0,5000	-
	Fendas	53,33	100,00	0,1413
	Onicocariose	33,33	33,33	1,0000
	Paraceratose granular	13,33	33,33	0,4095
ZTU	Nitidez borrada	62,50	100,00	0,2357
	Linha irregular	87,50	100,00	0,5403
Subungueal	Espessura subungueal (mm)	0,4267	-	-
	Lagos serosos	33,33	66,67	0,2933
	Neutrófilos	20,00	66,67	0,1094
	Camadas paraceratose	11	7	0,6142
	Bactérias	26,67	0,00	0,3243
Fungos	Dist: Localização (P+S)	53,33	100,00	0,1413
	Quantidade (pouca)	46,67	0,00	0,0208
	Morfologia	Leveduras	20,00	0,4096
		Agrupadas	100,00	-
		Brotamento	100,00	-
		Hifas	93,33	0,6546
		Septos	100,00	-

				Conclusão
	Artrosporação	42,86	33,33	0,7719
	Ramificação	42,86	66,67	0,4670
	Dismorfismo	42,86	100,00	0,0809
	Espessura (finas)	28,57	0,00	0,0495

FONTE: dados do estudo.

NOTAS: mm: milímetros. ZTU: zona de transição ungueal. P+S: placa e subungueal. Dist.: distribuição.

TABELA 7 – VALORES DE *P* NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DE CULTURAS COM *T. RUBRUM* E *CANDIDA* SPP.

Critérios		% de presença ou média nas culturas com <i>T. rubrum</i>	% de presença ou média nas culturas com <i>Candida</i> spp.	<i>p</i>
Placa	Espessura da placa (mm)	0,5000	0,3567	0,1898
	Fendas	53,33	50,00	0,9082
	Onicocariose	33,33	75,00	0,1443
	Paraceratose granular	13,33	25,00	0,5799
ZTU	Nitidez borrada	62,50	0,00	-
	Linha irregular	87,50	0,00	-
Subungueal	Espessura subungueal (mm)	0,4267	-	-
	Lagos serosos	33,33	0,00	0,3458
	Neutrófilos	20,00	0,00	0,4990
	Camadas paraceratose	11	0	-
	Bactérias	26,67	50,00	0,5093
Fungos	Dist. Localização (P+S)	53,33	25,00	0,3264
	Dist. Quantidade (pouca)	46,67	75,00	0,3264
	Morfologia	Leveduras	100,00	0,0041
		Agrupadas	75,00	0,3865
		Brotamento	0,00	0,0143
		Hifas	93,33	0,0037
		Septos	100,00	-
		Artrosporação	42,86	0,4158
		Ramificação	42,86	0,4158
		Dismorfismo	42,86	0,4158
		Espessura (finas)	28,57	0,4795
			100,00	0,4795

FONTE: dados do estudo.

NOTAS: mm: milímetros. ZTU: zona de transição ungueal. P+S: placa e subungueal. Dist.: distribuição.

TABELA 8 – VALORES DE *P* NA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS DE CULTURAS COM *ASPERGILLUS* SPP. E *CANDIDA* SPP. Continua

Critérios		% de presença ou média nas culturas com <i>Aspergillus</i> spp.	% de presença ou média nas culturas com <i>Candida</i> spp.	<i>p</i>
Placa	Espessura da placa (mm)	0,5000	0,3567	-
	Fendas	100,00	50,00	0,1797
	Onicocariose	33,33	75,00	0,3074
	Paraceratose granular	33,33	25,00	0,8231
ZTU	Nitidez borrada	100,00	0,00	-
	Linha irregular	100,00	0,00	-
Subungueal	Espessura subungueal (mm)	-	-	-
	Lagos serosos	66,67	0,00	0,1824
	Neutrófilos	66,67	0,00	0,1824
	Camadas paraceratose	7	0	-

				Conclusão	
Fungos	Bactérias		0,00	50,00	0,2207
	Dist.	Localização (P+S)	100,00	25,00	0,0662
		Quantidade (pouca)	0,00	75,00	0,0143
	Morfologia	Leveduras	0,00	100,00	-
		Agrupadas	-	75,00	-
		Brotamento	-	0,00	-
		Hifas	100,00	25,00	0,0662
		Septos	100,00	100,00	-
		Artrosporação	33,33	0,00	0,5637
		Ramificação	66,67	0,00	0,3173
		Dismorfismo	100,00	0,00	0,0833
		Espessura (finas)	0,00	100,00	-

FONTE: dados do estudo.

NOTAS: mm: milímetros. ZTU: zona de transição ungueal. P+S: placa e subungueal. Dist.: distribuição.

5 DISCUSSÃO

A eficácia do *clipping* na investigação da onicomicose já está mais do que bem comprovada na literatura atual, porém os artigos disponíveis se baseiam apenas em descrever métodos de fixação e processamento, em avaliar a validação do teste diagnóstico e em comparar resultados com outras técnicas de investigação. Nessa infinitude de informações científicas, ainda faltava o esmiuçamento do que pode ser analisado microscopicamente no *clipping*.

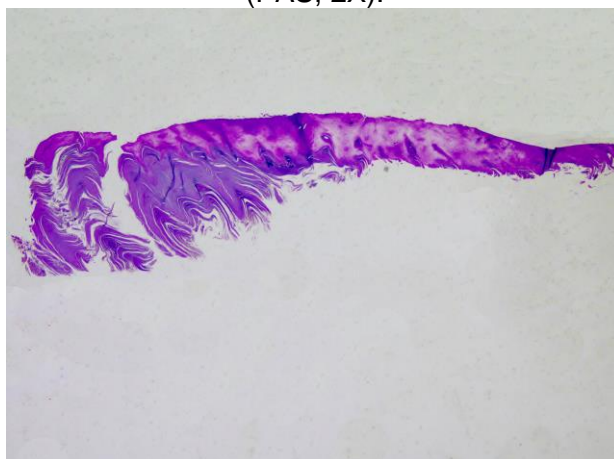
Das 62 amostras incluídas no estudo, 62,90% tiveram resultado positivo no exame micológico direto e 35,48% tiveram resultado positivo na cultura para fungos. Das culturas positivas, 81,82% tiveram desenvolvimento de fungos filamentosos e, dos fungos filamentosos, 83,33% foram identificados como *T. rubrum*. Era esperado que a espécie mais encontrada fosse realmente o *T. rubrum*, tal qual o estudo de Godoy-Martinez et al (2009) e de Souza et al (2010). Os 16,67% restantes das culturas filamentosas foram identificadas como *Aspergillus* spp. Nas demais culturas positivas (18,18%), houve desenvolvimento de fungos leveduriformes, todos identificados como *Candida* spp.

A realização das coletas demonstrou grande facilidade e praticidade do método de *clipping*. A coleta pode ser realizada com tesoura ou cortador de unha, na borda livre distal, com ao menos 2 mm de comprimento e 5 mm de largura. É importante que não haja esmalte, cremes, talco, ou outros produtos que possam atrapalhar a análise microscópica. Além disso, os pacientes devem ser instruídos a não cortar a unha tampouco limparem a região subungueal e o hiponíquio.

Chang et al (2007) avaliaram a possibilidade de processar apenas a porção subungueal dos *clippings* realizados na investigação de onicomicose, obtendo bons resultados e comprovando a importância da inclusão dessa região nas amostras. Isso reforça que se deve evitar realizar a curetagem imediatamente antes do *clipping* e, se a curetagem for realizada, é interessante aguardar o crescimento da unha por uma a duas semanas antes da coleta do *clipping*. Neste estudo, as coletas foram realizadas no mesmo dia, sem normatização da sequência da curetagem e do *clipping*. Também não há padronização da coleta descrita na literatura. Com isso, dos casos excluídos, dezesseis foram por prejuízo na coleta, que foi realizada na ordem curetagem – *clipping*, assim a camada subungueal foi curetada na mesma

localização da coleta do *clipping*, prejudicando a análise microscópica de critérios da zona de transição ungueal e da camada subungueal com PAS (Figura 22). Nas amostras seguintes, a coleta foi padronizada na sequência *clipping* – curetagem, corrigindo esse viés.

FIGURA 23 – UNHA COLETADA POR CLIIPPING APÓS COLETA POR CURETAGEM. NA METADE DIREITA DA AMOSTRA, NÃO É POSSÍVEL ANALISAR TODOS OS CRITÉRIOS (PAS, 2X).



Fonte: o autor (2016)

Quando há indicação de coleta tanto de curetagem (para exame micológico direto e cultura para fungos) quanto de *clipping*, recomenda-se realizar o *clipping* antes da curetagem, como por exemplo, já durante a consulta dermatológica. Se a coleta não for possível ao dermatologista durante a consulta, o próprio paciente pode ser instruído a realizar o *clipping* antes da curetagem subungueal, que é geralmente realizada em laboratórios de análises clínicas. Como comprovadamente a unha pode ser armazenada a seco, o paciente mesmo poderia encaminhá-la ao laboratório de patologia em embalagem apropriada, munido de requisições, documentos e solicitação preenchidos pelo médico.

Neste estudo, a primeira região analisada foi a placa, mais superior ou dorsal. Quanto mais superiores estão as alterações da placa vistas no *clipping*, mais relação elas tem com a matriz ungueal proximal, e quanto mais inferiores ou próximas à zona de transição ungueal, maior a relação com a matriz ungueal distal (WERNER; ANTUNES, 2013).

Foram tomadas medidas da espessura da placa e verificadas a presença de fendas, onicocariose e paraceratose granular (Tabela 5).

A média da espessura da placa foi de 0,5867 mm. Percebeu-se que a espessura da placa foi mais grossa nos casos de cultura negativa do que nos casos de cultura positiva ($p = 0,0863$) e mais fina nos casos de *Candida* spp. ($p = 0,2735$) em relação aos casos com *T. rubrum* e *Aspergillus* spp.

Placas ungueais de unhas normais visualizadas por microscopia eletrônica de varredura são descritas como intactas, com camadas compactas e laminares na superfície ventral (YUE, 2015). Nas unhas infectadas por *T. rubrum*, há descrição de um dano significativo à placa, com dissociação das camadas (SAGHER, 1948; YUE, 2015), critério aqui denominado de fendas e presente em 65% de todos os casos. A presença de fendas foi mais frequente nos casos em que as culturas se mostraram negativas ($p = 0,7936$), porém não houve relação entre a presença de fendas nos gêneros encontrados. Nos casos com culturas positivas, a presença de fendas esteve sempre presente quando houve desenvolvimento de *Aspergillus* spp. ($p = 0,1413$).

Na avaliação de onicocariose, foi mais frequente a negatividade na cultura das amostras com presença desse critério, mas pelo teste de Qui-quadrado não houve significância estatística dessa relação ($p = 0,2148$). Também não houve significância entre a presença de onicocariose e os gêneros encontrados nos casos de cultura positiva, embora a presença de onicocariose tenha sido mais frequente nos casos de *Candida* spp.

Já quando a paraceratose granular esteve presente no *clipping*, foi mais frequente a cultura ser negativa, com significância estatística pelo teste de Qui-quadrado ($p = 0,0089$). Isso levou a interpretação de que se visualizada paraceratose granular no *clipping*, mesmo com culturas negativas, deve-se manter a investigação, repetindo as coletas. Não houve significância entre presença de paraceratose granular e os gêneros encontrados nas culturas.

TABELA 9 – CRITÉRIOS DA PLACA UNGUEAL EM CASOS DE ONICOMICOSE.

Critério	Medida
Espessura da placa (média)	0,5867 mm (DP $\pm 0,2641$)
Fendas (presença)	61,29%
Onicocariose (presença)	51,61%
Paraceratose granular (presença)	40,32%

FONTE: o autor (2016).

A segunda área analisada foi a zona de transição ungueal (Tabela 6), que divide as regiões da placa e subungueal. Seria o equivalente tecidual da junção dermo-epidérmica e a zona da membrana basal. Em alguns casos, a zona de transição ungueal apresentou-se nítida, como uma linha comparável a membrana basal dividindo a epiderme da derme. Em outros casos, apresentou-se borrada, com pouca definição, ilustrativamente similar a um borramento da junção dermo-epidérmica. Percebeu-se neste estudo que o mais comum é a zona de transição ungueal ser borrada nos casos de onicomicose. Em três casos, a zona de transição ungueal foi definida como nítida, todos com cultura positiva para *T. rubrum* e em todos os casos com *Aspergillus* spp. a definição foi borrada; entretanto, pelo teste de Fisher, não houve significância estatística nessa diferença ($p = 0,2357$).

A linearidade da linha da zona de transição ungueal é comparável às papilas dérmicas. Nesse estudo foi descrita como regular, quando se apresentava retificada ou arqueada de modo simétrico e constante, ou como irregular, quando serrilhada, assimétrica ou tortuosa. O mais frequente entre as amostras de onicomicose estudadas foi o formato de linha irregular na zona de transição ungueal, sem diferença entre os casos com culturas positivas e negativas ($p = 0,5061$). Em todos os casos com desenvolvimento de *Aspergillus* spp., a linha foi descrita como irregular.

TABELA 10 – CRITÉRIOS DA ZONA DE TRANSIÇÃO UNGUEAL EM CASOS DE ONICOMICOSE.

Critério	%
Definição borrada	76,32
Definição nítida	23,66
Linha irregular	94,74
Linha regular	5,26

FONTE: o autor (2016).

A segunda região da unha, a subungueal (Tabela 7), tem íntima relação com o leito ungueal e é de grande relevância nos casos de onicomicose. É onde mais se espera encontrar alterações na onicomicose, visto que a apresentação clínica mais comum é a onicomicose subungueal disto-lateral, originada pela contaminação fúngica no hiponíquio e na borda livre. Além disso, a disseminação dos fungos nos casos de onicomicose ocorre principalmente no leito ungueal, desencadeando várias alterações na região subungueal. Na análise por microscopia eletrônica por

varredura de oito casos de onicomicose por *T. rubrum* descrita por Scherer e Scherer (2004) e por Yue et al (2015) foi vista destruição das estruturas subungueais e hifas perfurando finas camadas de queratinócitos. O local onde mais hifas foram visualizadas foi na porção ventral da unha. Outros critérios já descritos são a hiperqueratose subungueal extensa, paraceratose, lagos serosos, neutrófilos e bactérias (GROVER; REDDY; CHATURVEDI, 2003; FILLUS; TCHORNOBAY, 2009; MAYER; IZHAK; BERGMAN, 2012).

Vale ressaltar que a análise da camada subungueal isolada da placa, como estudaram Chang et al, (2007) e Nagar (2012), apesar de demonstrar bons resultados na investigação da presença de fungos, impede que critérios microscópicos da placa ungueal e da zona de transição ungueal sejam avaliados. Por essa razão, sugere-se que a amostra seja mantida íntegra, com a placa e a região subungueal.

TABELA 11 – CRITÉRIOS DA REGIÃO SUBUNGUEAL EM CASOS DE ONICOMICOSE.

Critério	Medida
Espessura região subungueal (média)	0,5361 mm (DP \pm 0,3069)
Lagos serosos (presença)	64,81%
Neutrófilos (presença)	40,74%
Camadas de paraceratose subungueal (média)	10,79 camadas (DP \pm 11,7920)
Bactérias (presença)	33,33%

FONTE: o autor (2016).

A partir dos dados obtidos, notou-se que a média de espessura da camada subungueal foi de 0,54 mm, com medidas mais finas nos casos com cultura positiva para *T. rubrum*, em relação aos demais agentes encontrados. Quando lagos serosos foram vistos no *clipping*, o mais comum foi das culturas resultarem negativas, com significância pelo teste de Qui-quadrado ($p = 0,0005$). Não houve significância estatística da presença de lagos serosos entre os diferentes gêneros, porém foi mais frequente nos casos de *Aspergillus* spp. e ausente nos casos de *Candida* sp.

Neutrófilos tendem a estarem presentes nos casos em que a cultura era negativa ($p = 0,0737$). Não houve diferença entre a presença de neutrófilos em *T. rubrum* e *Aspergillus* spp. ($p = 0,1094$), apesar de serem mais frequentes nos casos de *Aspergillus* spp. Fato interessante é que sempre que houve crescimento de leveduras, não foram vistos neutrófilos no *clipping*. Também o número de camadas

de paraceratose subungueal mostrou-se nula nos casos de *Candida* spp. Não houve diferença significativa entre a média do número de camadas entre as amostras com culturas positivas e negativas ($p = 0,1625$).

A ausência de lagos serosos, de neutrófilos e de camadas de paraceratose é visto em unhas normais (WERNER; ANTUNES, 2003). Isso poderia indicar que a presença de leveduras como causadores de onicomicose não cause resposta inflamatória significativa em alguns pacientes, mas ainda mais provável é que a presença de leveduras em alguns casos seja simplesmente contaminação, atrapalhando a investigação do agente causador quando o único método utilizado é a cultura.

Não houve significância estatística pelo teste de Qui-quadrado para a presença de bactérias em relação ao resultado das culturas ($p = 0,3235$) nem aos gêneros encontrados, mas bactérias foram mais vistas nos casos com *Aspergillus* spp.

Outro estudo com *clippings* comparou as alterações entre cinco casos de unhas normais, 14 casos de psoríase ungueal e quatro casos de onicomicose. Nas unhas normais, os autores relataram uniformidade e hiperqueratose compacta. Nos casos com psoríase, distrofia com focos de paraqueratose e neutrófilos esparsos no leito e na placa. Nos quatro casos de onicomicose, descreveram hifas cor carmesim ao PAS, evidente paraqueratose e raros neutrófilos (MACHLER; KIRSNER; ELGART, 1998).

Na análise microscópica do *clipping* de unhas normais em um estudo de 2013, de Werner e Antunes, com 15 pares de unhas, a espessura da placa ungueal teve média de 0,36mm (0,25 a 0,50 mm, DP $\pm 0,06$). Onicocariose foi vista em 41% das amostras analisadas. A espessura da região subungueal teve média de 0,11 mm (0 a 0,31mm, DP $\pm 0,07$). Paraqueratose subungueal esteve presente em 86% das unhas, em média com 5,6 camadas (1 a 13 camadas, DP $\pm 3,5$). Bactérias em pequena quantidade foram vistas em 60% dos espécimes na região subungueal e principalmente nas extremidades. Em nenhum caso desse estudo foram vistos neutrófilos ou lagos serosos.

Outro estudo, publicado em 2015, comparou os achados do *clipping* em unhas distróficas e em unhas normais de 96 pacientes com diagnóstico clínico de psoríase vulgar. A média da espessura da placa no grupo com onicodistrofia foi de 0,44 mm. No mesmo grupo, a média da espessura da camada subungueal foi de

0,19 mm. A média do número de camadas de paraceratose subungueal foi de 4,5 camadas. Neutrófilos estavam presentes em 12% desses casos, lagos serosos em 46%, bactérias em 74% e fungos (geralmente esporos) em 20% (WERNER, FONSECA, SEIDEL, 2015).

A Tabela 8 compara os dados do estudo de 2013 com *clipping* de unhas normais, com os de psoríase ungueal de 2015 e com os de onicomicose.

TABELA 12 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS ESTUDOS DE ONICODISTROFIA EM PACIENTES COM PSORÍASE (PSORÍASE UNGUEAL) E DE ONICOMICOSE.

Crítérios	Unhas normais ^a	Psoríase ungueal ^b	Onicomicose ^c
Número de amostras	30	96	61
Espessura da placa (média em mm)	0,36	0,44	0,59
Onicocariose (% de presença)	41,00	-	53,33
Espessura da subungueal (média em mm)	0,11	0,19	0,54
Lagos serosos (% de presença)	0,00	46,00	64,81
Neutrófilos (% de presença)	0,00	12,00	40,74
Camadas de paraceratose (média)	5,60	4,50	10,79
Bactérias (% de presença)	60,00	74,00	32,73

FONTE: a. Werner; Antunes, 2013. b. Werner; Fonseca; Seidel, 2015. c. Trevisan; Werner; Lameira, 2016.

Na comparação com esses dados da literatura foi percebido que a placa tende a ser muito mais espessa na onicomicose do que na distrofia da psoríase ungueal e ainda maior do que nas unhas normais ($p < 0,0001$). Pode se levar em conta que espessuras próximas a média das unhas normais, mais finas, em casos suspeitos de onicomicose tem uma maior probabilidade do fungo causador ser a *Candida* spp. A presença de onicocariose é um pouco mais frequente (12%) nos casos de onicomicose em relação às unhas normais, porém sem significância estatística ($p = 0,2831$).

Já a espessura da região subungueal é muito maior nos casos de onicomicose ($p < 0,0001$) do que em relação às unhas sãs e em relação à psoríase ungueal. Lagos serosos estão ausentes em unhas sãs e presentes nos casos de onicomicose ($p < 0,0001$). Também estão presentes nos casos de psoríase ungueal ($p < 0,0001$), porém são 18% mais frequentes nos casos de onicomicose ($p = 0,0347$). A presença de neutrófilos não ocorre nas unhas normais, mas ocorre nas unhas com onicomicose ($p = 0,0001$) e com psoríase ungueal ($p = 0,0474$). A

comparação da proporção de presença de neutrófilos entre casos de onicomicose e de psoríase ungueal teve significância estatística, sendo muito mais frequente (28% mais) na onicomicose ($p = 0,0001$). As camadas de paraceratose são vistas numa média muito maior nos casos de onicomicose do que em relação às unhas normais ($p = 0,0172$) e às unhas com psoríase ($p < 0,0001$). A presença de bactérias é mais frequente nas unhas sãs do que nas unhas com onicomicose (28% a mais, $p = 0,0129$) e muito mais frequente nos casos de psoríase ungueal (42% a mais, $p < 0,0001$).

Não há estudos descrevendo a zona de transição ungueal para comparação com os dados coletados nos casos com onicomicose, mas analisando os aspectos gerais dessa zona, é fortemente indicativo de onicomicose quando a linha entre a placa e a região subungueal é borrada e irregular.

A segunda etapa deste estudo foi descrever os aspectos de distribuição e morfologia dos fungos (Tabela 9). Das 62 amostras analisadas, 64,52% (40) tiveram resultado negativo e 35,48% (22), positivo nas culturas. Das culturas positivas, 29,03% (18) tiveram desenvolvimento de fungos filamentosos e 6,45% (4) de leveduras.

Pierard et al (2006) descreveram a quantidade de fungos como medida de extensão da contaminação. Aqui neste estudo, foi separada em pouca, moderada e muita. Quando as culturas tiveram desenvolvimento de *T. rubrum*, foi mais comum encontrar pouca quantidade, enquanto nos casos com *Aspergillus* spp. e *Candida* spp., foi encontrado quantidade moderada de fungos nos *clippings* ($p = 0,0208$ e $p = 0,3264$).

A localização dos fungos pode auxiliar na análise clínica, como na onicomicose distrófica total, na qual a invasão miceliana ocorre em toda a espessura da placa ungueal (GIANNI et al, 2001). Além disso, há um relato de que hifas encontradas nas regiões mais profundas (subungueal) das unhas corresponderiam à infecção pelo *T. rubrum* (SAGHER, 1948). No presente estudo, como esperado, o mais frequente nos *clippings* foi distribuição de fungos na região subungueal, com 38,71% encontrados apenas na região subungueal e 46,77% (53) tanto na região subungueal quanto na placa. Na maior parte dos 14,52% dos casos com fungos apenas na placa, houve desenvolvimento de *Candida* spp. na cultura, o que poderia indicar casos de contaminação sem infecção. Pela distribuição dos fungos não foi

possível prever com significância se o resultado das culturas seria positivo ou negativo ($p = 0,9730$) nem quais gêneros poderiam ser encontrados.

Na análise morfológica dos fungos foi avaliada a presença de estruturas leveduriformes e de hifas. As estruturas leveduriformes são vistas na microscopia ungueal como esporos esféricos agrupados e por vezes com ramificações e pseudo-hifas ou curtos filamentos (SAGHER, 1948). A sua presença teve correlação com alta probabilidade de cultura positiva ($p = 0,0044$), especialmente com crescimento de *Candida* spp. ($p = 0,0041$) em relação ao *T. rubrum*.

Quando visualizadas estruturas leveduriformes, elas foram categorizadas conforme seu agrupamento e conforme presença de brotamentos. O mais frequente foi distribuição agrupada das leveduras, porém não houve estatística significativa para definir se o aspecto das culturas seria leveduriforme ou filamentosa ($p = 0,495$).

Quando houve brotamentos foi mais provável que a cultura desenvolvesse *T. rubrum* ($p = 0,0143$). Isso pode significar que as estruturas aqui chamadas de brotamentos possam ser, na verdade, hifas tortuosas ou em corte longitudinal, ou ainda visualização de clamidosporos, estruturas de resistência do micélio, formadas a partir de autólise da parede e desenvolvimento de uma parede secundária grossa. Essas estruturas sobrevivem em situações adversas ou permanecem em estado de latência (ARENAS, 2014). Em apoio a essa linha de raciocínio, Yue et al (2015) visualizaram na microscopia eletrônica de varredura, algumas estruturas leveduriformes e algumas similares à pseudo-hifas em casos confirmados de onicomicose causada por *T. rubrum*, podendo ser um fenômeno nunca descrito no *clipping* e de grande confusão na análise microscópica da unha.

A presença de hifas teve significância estatística entre os diferentes gêneros encontrados ($p = 0,0048$), com maior frequência de hifas nos casos com crescimento de *T. rubrum*. Esse dado confirma uma análise de 2009 que demonstrou uma alta correlação positiva entre *clipping* positivo e crescimento de dermatófitos na cultura. Nessa mesma análise notou-se que casos com cultura positiva e *clipping* negativo tiveram crescimento de fungos não-dermatófitos na cultura, demonstrando que a presença de não-dermatófitos é mais correlacionada ao *clipping* negativo (ALKHAYAT et al, 2009).

Em todos os casos com hifas e culturas positivas foi verificada a presença de septos. Isso era um achado esperado, visto que fungos filamentosos não septados (inferiores ou cenocíticos) não causam infecção cutânea superficial. Não

houve significância estatística da presença de septos e o resultado ($p = 0,3261$) nem o aspecto da cultura. A artrosporação, forma de reprodução assexuada de alguns fungos, foi mais frequentemente visualizada em casos de *T. rubrum*, mas não foi possível relacionar a presença de artrosporação com a positividade da cultura ($p = 0,6822$) nem houve diferença na comparação com a presença dos casos com *Aspergillus* spp. ($p = 0,7719$). Quando ramificações foram vistas, foi provável que a cultura resultasse positiva ($p = 0,0418$), porém não houve diferença entre os resultados das culturas quanto ao gênero nem quanto ao aspecto (se leveduriforme ou filamentoso) ($p = 0,0808$). Embora ramificações sejam descritas na análise por microscopia eletrônica de varredura de hifas de *T. rubrum* (YUE et al, 2015), neste estudo não houve significância estatística da sua presença para diferenciar os casos com *T. rubrum* contra os com *Aspergillus* spp. ($p = 0,4670$). A angulação das ramificações não foi avaliada.

Dismorfismo foi mais relacionado aos casos com crescimento de *T. rubrum* nas culturas quando comparado aos demais gêneros (*Candida* spp., $p = 0,4158$ e *Aspergillus* spp., $p = 0,0809$). Há descrições divergentes da morfologia das hifas de dermatófitos. Um estudo relata hifas grossas, ramificadas, segmentadas, principalmente agrupadas no centro da unha, com poucos esporos na placa podendo formar massas na região subungueal, em casos de *T. rubrum* (SAGHER, 1948). Outro estudo relata hifas regulares, septadas e de cor rosa na coloração de PAS de casos causados por dermatófitos, contra hifas espessas, rugosas, ramificadas e com septos irregulares nos casos causados por não dermatófitos (GIANNI et al, 2001). Um estudo de 2015 analisou a morfologia das hifas de macrocultivos de *T. rubrum* por microscopia eletrônica de varredura e as descreveu como retificadas, lisas, com ramificações e superfície intacta, com algumas apresentando áreas atrofiadas (YUE, 2015). A interpretação desses dados é que existe polimorfismo dos fungos, com várias estruturas passíveis de serem encontradas para uma mesma espécie de fungo filamentoso (Figuras 23 e 24).

Os autores deste presente estudo levantam a hipótese de que a morfologia das hifas possa sofrer interferência, por exemplo, do *status* nutricional dos fungos e da resposta inflamatória do hospedeiro. Quando há espaço para invasão e riqueza de nutrientes, as hifas seriam cheias e lisas, enquanto a escassez de nutrientes causaria rugosidades e tortuosidades. Também se levanta a hipótese de que maior resposta inflamatória causaria mais dismorfismo, porém neste estudo esses fatores

não apresentaram relação estatística significativa ($p = 0,2475$). Baseado nessa conjectura sugere-se que o dimorfismo seja interpretado como reflexo do sofrimento do fungo nos casos de escassez de nutrientes e oxigênio, como nos casos de onicomiose em quadros de insuficiência arterial periférica, ou nos casos de ação de mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, a presença de dimorfismo seria fator independente da espécie causadora.

Finalmente, não foi encontrada significância estatística entre a espessura das hifas de *T. rubrum* e *Candida* spp. ($p = 0,4795$), mas 100% dos casos com *Aspergillus* spp. apresentou hifas grossas ($p = 0,0495$, em relação a *T. rubrum*) e há relatos literários de que hifas espessas sejam mais relacionadas a não-dermatófitos (GIANNI et al, 2001).

TABELA 13 – CRITÉRIOS DE DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DOS FUNGOS EM CASOS DE ONICOMICOSE.

Critérios		Presença (%)
Distribuição:		
Localização	Placa	14,52%
	Subungueal	38,71%
	Placa + subungueal	46,77%
Quantidade	Pouca	45,16%
	Moderada	30,65%
	Muita	24,19%
Morfologia:		
Estruturas leveduriformes		14,52%
Agrupamento	Agrupadas	88,89%
	Isoladas	11,11%
Brotamento		33,33%
Hifas		90,32%
Septos		96,43%
Artrosporação		42,86%
Ramificações		26,79%
Dimorfismo		51,79%
Espessura	Finas	19,64%
	Grossas	58,93%
	Finas + grossas	21,43%

FONTE: o autor (2016).

Lilly et al (2006) avaliaram a sensibilidade e o custo-benefício entre os testes diagnósticos. Esses autores mostraram alta sensibilidade do *clipping* (98,8%),

significativamente mais sensível que todos os testes exceto que o exame micológico direto com *chlorazol black*. Esse valor de sensibilidade significa que entre os casos negativos do *clipping*, apenas 1,2% eram falso-negativos. A cultura em meio específico para dermatófitos foi o método menos sensível. Para diagnóstico de onicomicose, o exame micológico direto foi considerado o de maior custo-efetividade, e o *clipping* o de menos. Em uma análise tailandesa de 2007, o custo do exame micológico direto foi de US\$ 1,40, da cultura de US\$ 6,00 e do *clipping* de US\$ 36,00 (HSIAO et al, 2007).

Blake et al (2015) demonstraram que o *clipping* foi o método mais caro quando comparado ao exame micológico direto e à cultura para fungos. Porém, os autores defendem que o *clipping* é o método com maior probabilidade de resultado positivo, com a maior sensibilidade e o mais confiável para resultados positivos, o que torna que a sua realização isolada válida e mais barata do que a dos três exames em conjunto. Outros autores verificaram o tempo necessário para cada resultado. O exame micológico direto levou em média 30 minutos, o *clipping* um a quatro dias e a cultura três a seis semanas (HSIAO et al, 2007; JUNG et al, 2015). Porém, considerando a facilidade e agilidade na coleta de material para *clipping*, há menor influência da experiência do responsável por essa etapa do estudo, com diminuição dos falsos negativos.

Em um estudo recente, pesquisadores verificaram o custo da investigação da onicomicose previamente ao tratamento com terbinafina sistêmica 250mg ao dia por 12 semanas (US\$ 53) e previamente ao tratamento com efinaconazol 10% tópico para uma unha por 48 semanas (US\$ 2307). A confirmação do diagnóstico de onicomicose por meio do *clipping* trouxe uma economia de US\$ 406 por unha quando realizada antes do início do tratamento de uma unha com efinaconazol 10%, correspondendo a uma diminuição de 17,6% do custo total do tratamento por paciente, enquanto a economia com a confirmação feita por exame micológico direto foi de 11,8% (MIKAILOV, 2016). Em contrapartida, nesse mesmo estudo, foi demonstrado que quando a prevalência da onicomicose é de 75%, o tratamento empírico é mais custo-efetivo do que a confirmação por exame micológico direto ou por *clipping* antes do início do tratamento com terbinafina oral. É importante salientar que quando diminui a prevalência da onicomicose, o custo do *clipping* por paciente também diminui enquanto do exame micológico direto aumenta (MIKAILOV, 2016).

Isso, associado aos altos valores de sensibilidade do *clipping*, o faz uma excelente opção de exame de triagem para a onicomicose.

Além disso, no Brasil o custo do tratamento com terbinafina sistêmica 250mg ao dia por 12 semanas varia de R\$300 a R\$690 (FARMÁCIA PREÇO POPULAR, julho de 2016), sem considerar o custo dos exames de monitorização hepática. O efinaconazol 10% ainda não está disponível. Com esse custo, a comprovação do diagnóstico pelos métodos menos subjetivos possíveis, como o *clipping* e a cultura, leva a maior credibilidade do diagnóstico e melhor adesão ao tratamento.

Como sugerem Weinberg et al (2003, p.196), o *clipping* é “potencialmente o método único de escolha para avaliação de onicomicose” (tradução dos autores) e se apenas for possível um único exame, a prioridade deve ser dada ao *clipping*, visto a possibilidade de confirmação diagnóstica, a sua maior sensibilidade, o seu menor custo, o seu menor tempo para resultado e ser menos dependente da coleta e do examinador. Também alguns autores já propuseram considerar o *clipping* como exame padrão-ouro para diagnóstico de onicomicose (BOROWSKI et al, 2001; WISLMANN-THEIS, 2011), ainda a cultura é o método definitivo para elucidação da espécie causadora.

Entre outras vantagens do *clipping* encontram-se a possibilidade de diagnóstico de outras onicopatias, percepção de outras alterações como a morfologia e a distribuição dos fungos em relação ao aparato ungueal, estudo do grau de comprometimento da unha, avaliação de inflamação desencadeada e reconhecimento diferentes estruturas como hifas, pseudohifas, leveduras e artrosporação. Acrescenta-se ainda o aumento da acurácia diagnóstica, quantificação e localização do fungo, diferenciação de fungos colonizantes de patógenos pelo grau de penetração das hifas na unha e auxílio na prognose (PIÉRARD; QUATRESOOZ; ARRESE, 2006).

A avaliação de prognóstico da onicomicose através do *clipping* pode ainda ser muito explorada. Nas biópsias de placa e leito ungueal, Piérard, Quatresooz e Arrese (2006) descrevem como critérios prognósticos a quantidade de fungos como medida de extensão da contaminação; a presença de clamidosporos como células latentes e resistentes a condições adversas, podendo causar refratariedade nos tratamentos; a presença de artrosporação como causadores de recorrência; e a presença de estruturas denominadas *sporodochium*, agregados de hifas com ramificações, clamidosporos e conídeos, encontrados na região distal subungueal da

unha e com potencial de disseminação e de auto-inoculação da onicomicose. Sugere-se usar esses mesmos critérios nas análises do *clipping*, acrescentando uma enorme vantagem sobre o exame micológico direto e sobre a cultura.

Ressalta-se que, apesar de o *clipping* se tratar de um método de investigação útil, prático e com muitas vantagens, a cultura continua sendo o método com maior especificidade e definitivo na pesquisa do agente causador da onicomicose (REISBERG et al, 2003). São também restrições do *clipping*, além da não comprovação do patógeno, sua custo-efetividade alta, a necessidade de repetição da coleta em casos de ausência de material subungueal, a dependência de estrutura de laboratório e colorações para sua realização e a dificuldade de processamento das amostras.

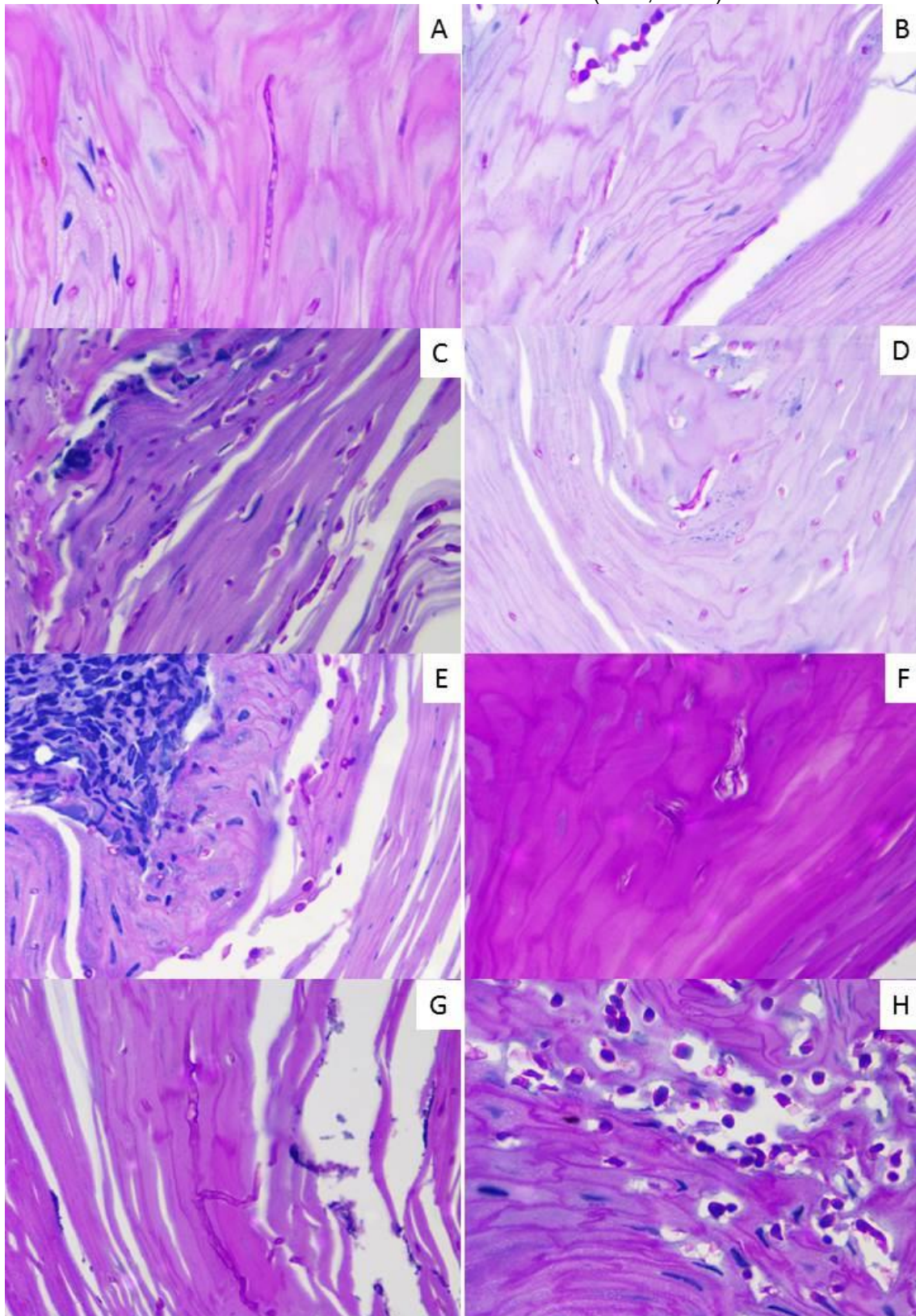
5.1 PONTOS ESSENCIAIS

Foi possível estabelecer os principais indícios microscópicos vistos no *clipping* de casos de onicomicose e quais os critérios podem direcionar as suspeitas dos agentes causadores. Como critérios microscópicos da análise da unha úteis no diagnóstico de onicomicose através do *clipping* foram elencados a espessura da placa, com média de 0,59 mm nesse estudo, quando maior que 0,50 mm há grande probabilidade de ser onicomicose; fendas estavam presentes em 61,29% dos casos, sendo que estavam presentes em todos os casos com desenvolvimento de *Aspergillus* spp.; onicocariose presente em 51,61% dos casos, sem diferença significativa da presença em unhas sãs; paraceratose granular presente em 40,32%, quando presente é mais provável que a cultura seja negativa mesmo nos casos de onicomicose confirmadas pelo *clipping*. A linha da zona de transição ungueal borrada foi encontrada em 76,32% dos casos de onicomicose e em todos os casos causados por *Aspergillus* spp; linha da zona de transição ungueal irregular foi vista em 94,74% dos casos de onicomicose, e em todos os casos causados por *Aspergillus* spp. A espessura da camada subungueal teve média de 0,54 mm nesse estudo e quando maior que 0,31 mm há grande probabilidade de ser onicomicose; lagos serosos, presentes em 64,18% dos casos, são indicativos de onicomicose e de psoríase ungueal, porém são 18% mais frequentes na onicomicose; neutrófilos

estão presentes em 40,74% dos casos de onicomicose, 28% a mais do que nos casos de psoríase ungueal e em nenhum dos casos de onicomicose causados por leveduras foram vistos neutrófilos; quanto mais camadas de paraceratose, maior a chance de ser onicomicose em relação a unhas sãs e com psoríase ungueal, tendo uma média de 10,79 camadas nos casos de onicomicose, sendo importante ressaltar que nos casos de onicomicose causados por leveduras, não houve nenhuma camada de paraceratose subungueal; presença de bactérias ocorreu em 33,33% dos casos e foi menos frequente do que nas unhas sãs e muito menos frequente do que na psoríase ungueal; quanto mais espessa a unha e, principalmente quanto mais espessa a camada subungueal, maior a chance de o caso ser de onicomicose.

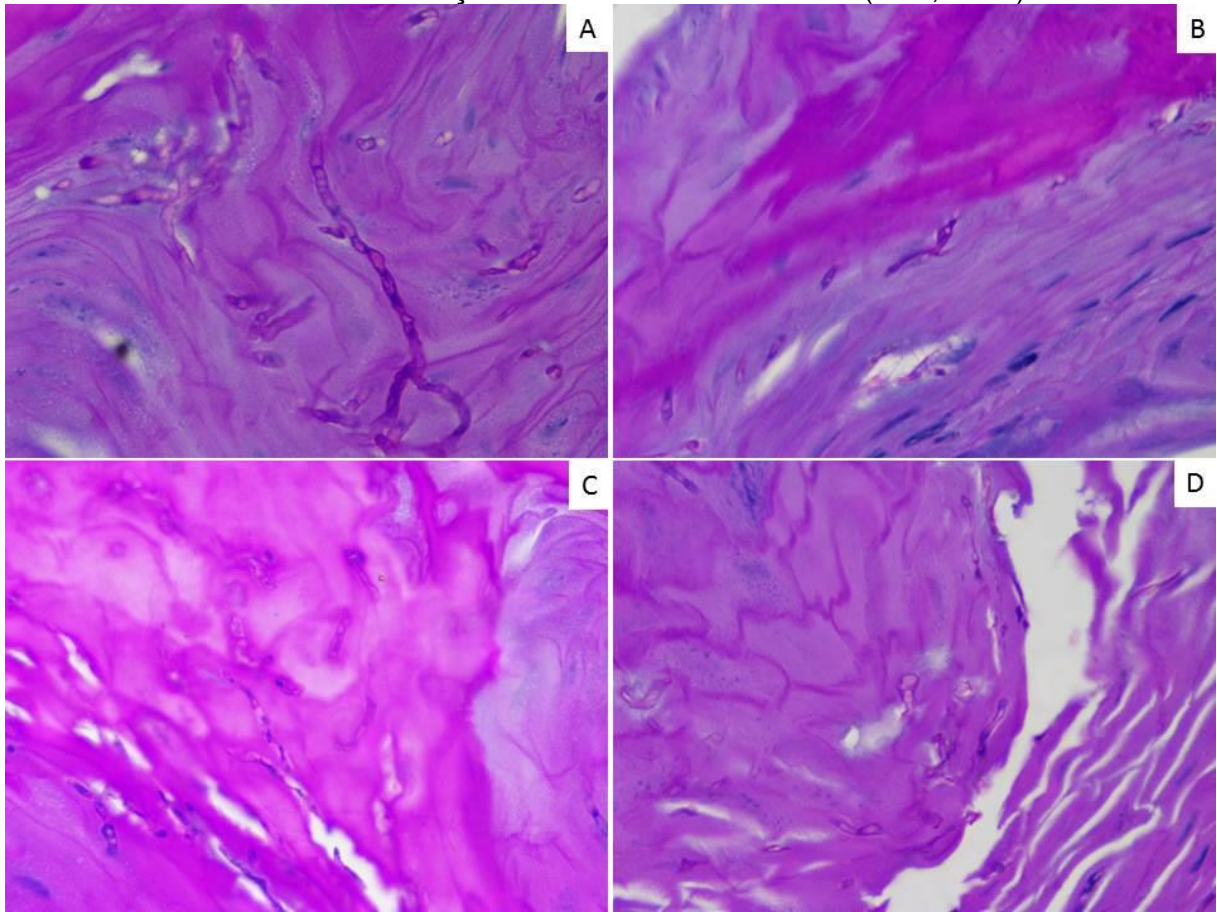
Os achados da análise dos fungos tiveram pouca influência na suspeita dos agentes etiológicos. Como pontos principais, destacam-se ser mais frequente que poucos fungos sejam vistos no *clipping* (45,16%) e quando há poucos fungos, é maior a chance da infecção ser por *T. rubrum*; quando há quantidade moderada de fungos, é maior a chance de infecção por *Aspergillus* spp. A localização mais comum de se encontrarem fungos é na placa e na região subungueal (46,77%); quando vistos na placa, é maior a chance de crescimento de leveduras na cultura. Presença de estruturas leveduriformes foi vista em 14,52%, fortemente indicativa de culturas positivas para *Candida* spp.; quando vistas estruturas leveduriformes, elas encontravam-se mais frequentemente dispostas de maneira agrupada (88,89%); estruturas similares a brotamento foram vistas em 33,33% dos casos com leveduras no *clipping*, porém nesses casos foi mais comum o desenvolvimento de *T. rubrum* nas culturas, podendo indicar que estruturas similares a brotamentos sejam, na verdade, estruturas de micélios como hifas dilatadas, em corte transversal ou clamidosporos. Hifas foram vistas em 90,32% dos casos, com maior probabilidade de crescimento de *T. rubrum* na cultura; septos foram vistos em 96,43% dos casos com hifas; artrosporação foi vista em 42,86% os casos com hifas, sendo mais frequente a relação com o desenvolvimento de *T. rubrum* nas culturas; ramificações estiveram presentes em 26,79% dos casos com hifas, tendo correspondência com a positividade nas culturas; dismorfismo foi visto em 51,79% das hifas, sendo mais relacionado ao *T. rubrum*; a espessura de hifas mais encontrada foi grossa, com 58,93% dos casos.

FIGURA 24 – POLIMORFISMO DO *T. RUBRUM*. A. HIFA SEPTADA HIALINA REGULAR. B. HIFA COM ARTROSPORAÇÃO (SUPERIOR). C. ESPOROS ARREDONDADOS COM NÚCLEOS VISÍVEIS. D. HIFA DISMÓRFICA, IRREGULAR. E. ESTRUTURAS ARREDONDADAS, LEVEDURIFORMES. F. HIFA DILATADA. G. HIFA TORTUOSA E COM DILATAÇÕES. H. ESPOROS ARREDONDADOS E ESTRUTURAS SIMILARES A LEVEDURAS COM BROTAMENTO. (PAS, 100X)



FONTE: o autor (2016).

FIGURA 25 – MORFOLOGIA DO *ASPERGILLUS* SP. A. HIFA TORTUOSA, COM ASPECTO DE TORCIDA E COM RAMIFICAÇÃO. B. DILATAÇÃO (CLAMIDOSPORO). C. HIFA COM DILATAÇÕES. D. HIFA DISMÓRFICA. (PAS, 100X)



FONTE: o autor (2016).

6 CONCLUSÃO

Esse estudo descreveu como critérios principais do *clipping* em casos de onicomicose maior média de espessura da placa e da região subungueal, maior média do número de camadas de paraceratose subungueal, presença de fendas (61,29%), linha da zona de transição ungueal borrada e irregular, presença de lagos serosos (64,81%) e de neutrófilos (40,74%). Bactérias são muito mais frequentes de serem visualizadas em psoríase ungueal, depois em unhas sãs e em último lugar em casos de onicomicose (33,33%).

A média encontrada para espessura da placa foi de 0,59 mm, sendo que medidas superiores a 0,50 mm são fortemente indicativas de onicomicose. Já a média da espessura da região subungueal vista foi de 0,54 mm. Quando comparado a dados encontrados na literatura, pode ser considerado que valores da região subungueal acima de 0,31 mm são muito sugestivos de onicomicose.

As camadas de paraceratose são vistas em maior número nos casos de onicomicose em relação às unhas sãs e à psoríase ungueal, com uma média de 10,79 camadas. Entretanto, quando a infecção ungueal é causada por *Candida* spp., é possível que nenhuma camada subungueal seja vista.

A quantidade de fungos geralmente é pouca nos casos de onicomicose, quando quantidades maiores são *Aspergillus* spp. nas culturas. A localização mais comum de serem encontrados os fungos é na placa e na região subungueal concomitantemente. Quando apenas a placa está acometida é mais provável o crescimento de *Candida* spp. nas culturas.

Quando leveduras são vistas no *clipping*, geralmente são encontradas agrupadas (88,89% dos casos) e pode-se considerar que a infecção seja realmente causada por *Candida* spp. Estruturas com semelhança à divisão por brotamento das leveduras devem ser avaliadas com muita cautela, pois podem significar alterações de hifas como clamidosporos ou tortuosidades em cortes transversais.

Hifas foram vistas em 90,32% dos casos de onicomicose, frequentemente com espessuras grossas (58,93%). A presença de septos é sempre esperada quando há hifas no *clipping*. Já a artrosporação ocorreu em apenas 42,86% dos casos e foi vista principalmente quando a infecção ungueal era causada por *T. rubrum*. Ramificações foram pouco vistas (26,79%), porém são preditores de

resultados positivos nas culturas. Dismorfismo ocorrem em mais de 50% dos casos de onicomicoses com hifas no *clipping* e tem uma chance maior de indicar infecção por *T. rubrum*.

Os critérios analisados na distribuição e na morfologia dos fungos que podem auxiliar na investigação do agente etiológico da onicomicose, indicando maior probabilidade da presença de *T. rubrum*, são pequena quantidade de fungos, estruturas similares a brotamento, presença de hifas septadas, ramificações e dismorfismo. Medida da espessura da placa próxima a unhas normais, onicocariose, ausência de neutrófilos, ausência de camadas de paraceratose, presença de fungos na placa e presença de estruturas leveduriformes agrupadas são sugestivas de presença de *Candida* spp. Casos causados por *Aspergillus* spp. provavelmente apresentem fendas, linha da zona de transição ungueal borrada e irregular, hifas grossas e fungos em quantidade moderada.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ponto importante no desenho da metodologia desse estudo é que não se deve realizar a curetagem imediatamente antes do *clipping*. A curetagem de material subungueal para exame micológico direto ou para cultura prejudica a análise microscópica de critérios da zona de transição ungueal e da camada subungueal com PAS e por isso, se realizada, é interessante aguardar o crescimento da unha por uma a duas semanas antes da coleta do *clipping* ou recomenda-se realizá-lo antes da curetagem.

O *clipping* é muito útil no diagnóstico diferencial de onicodistrofias, podendo diferenciar onicomiose de distrofia ungueal da psoríase. A placa e a região subungueal tendem a serem muito mais espessas na onicomiose do que na distrofia da psoríase ungueal. Também o número de camadas de paraceratose é maior. Lagos serosos e neutrófilos são mais frequentes na onicomiose e interessantemente a ausência de neutrófilos correlacionou-se com onicomiose por leveduras. Ao contrário, a presença de bactérias é mais frequente na psoríase ungueal. Também, através do *clipping* na distrofia ungueal de casos de psoríase, é possível verificar a presença de contaminação por fungos (ou onicotização da psoríase ungueal), o que pode ser fator de piora do quadro.

Apesar de o *T. rubrum* ser mais comumente descrito como hifas finas septadas, neste estudo foi visto grande variação morfológica do micélio, com hifas grossas, dilatadas, tortuosas, com artrosporação e vesículas. Esse poliformismo deve ser levado em consideração pelo patologista, não servindo como único critério para sugerir a onicomiose ser causada por dermatófito ou por não-dermatófito. Apenas a presença de estruturas leveduriformes serve como critério morfológico no auxílio da investigação do agente etiológico, sugerindo fortemente infecção por fungos do gênero *Candida*.

O exame microscópico da unha é um excelente método diagnóstico, comprovadamente mais sensível que o exame micológico direto e que a cultura. Em média, a sua sensibilidade é de 81% (contra 69% do exame micológico direto e 50% da cultura) e o seu valor preditivo positivo é de 76% (contra 63% do exame micológico direto e 50% da cultura), portanto o exame único inicial para investigação da onicomiose comprovadamente mais sensível é o *clipping*.

Dentre casos com resultado negativo no *clipping*, uma média de 19% de falsos negativos tende a ocorrer, enquanto com o exame micológico direto, esse índice de erro sobe para 31%. Talvez seja agora o momento de rever o papel do exame micológico direto como método inicial, já que pode prejudicar a coleta do *clipping*, tem alto índice de resultados falso-negativos e não acrescenta outras análises na investigação da microscopia ungueal. Além disso, questiona-se se a se cultura não pode ser considerada apenas após a análise do *clipping*, tendo como fator importante na indicação de coleta a presença de paraceratose granular.

REFERÊNCIAS

- ALKHAYAT, H.; AL-SULAILI, N.; O'BRIEN, E.; MCCUAIG, C.; WATTERS, K. The PAS Stain for Routine Diagnosis of Onychomycosis. Bahrain Medical Bulletin. 2009; 31(2):1-8.
- ARENAS, R. Micologia médica ilustrada. 5. Ed. Ciudad de Mexico : Mc Graw Hill, 2014.
- BELYAYEVA, E.; GREGORIOU, S.; CHALIKIAS, J.; KONTOCHRISTOPOULOS, G.; KOUMANTAKI, E.; MAKRIS, M.; KOTI, I.; KATOULIS, A.; KATSAMBAS, A.; RIGOPOULOS, D. The impact of nail disorders on quality of life. 2013; 23(3):366-71.
- BLAKE, N.; ZHU, J.; HERNANDEZ, G.; JULIANO, P. J. A retrospective review of diagnostic testing for onychomycosis of the foot. J Am Podiatr Med Assoc. 2015; 105(6):503-8.
- BORKOWSKI, P.; WILLIAMS, M.; HOLEWINSKI, J.; BOKOTIC, B. Onychomycosis: an analysis of 50 cases and a comparison of diagnostic techniques. J Am Podiatr Med Assoc 2001; 91:351-5.
- CHANG, A.; WHARTON, J.; TAM, S.; KOVICH, O. I.; KAMINO, H. A modified approach to the histologic diagnosis of onychomycosis. J Am Acad Dermatol. 2007; 57(5):849-53.
- CHAUVIN F.M. New diagnostic techniques. J Eur Acad Dermatol Venereal. 2005; 19(1):20-4.
- FAERGEMANN, J.; BARAN, R. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of onychomycosis. Br J Dermatol. 2003; 149(65):1-4.
- FILLUS-NETO, J.; TCHORNOBAY, A.M. Como o *clipping* pode auxiliar o dermatologista. An. Bras. Dermatol. 2009; 84(2):173-6.
- FLECKMAN, P.; OMURA, E.F. Histopathology of the nail. Adv Dermatol. 2001; 17:385-406.
- GHANNOUM, M.A.; HAJJEH R.A.; SCHER, R.; KONNIKOV, N.; GUPTA, A.K.; SUMMERBELL, R., et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. J Am Acad Dermatol. 2000; 43(4):641-8.
- GIANNI, C.; MORELLI, V.; CERRI, A.; GREVO, C.; ROSSINI, P.; GUIDUCCI, A.; et al. Usefulness of histological examination for the diagnosis of onychomycosis. Dermatology 2001; 202:283-8.
- GODOY-MARTINEZ, P.; NUNES, F.G.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; URRUTIA, M.; ZAROR, L.; SILVA, V.; FISCHMAN, O. Onychomiosis in São Paulo, Brazil. Mycopathologia. 2009; 168(3):111-6.
- GOETTMANN-BONVALLOT, S. Clinical Types of onychomycosis. Ann Dermatol

Venereol. 2003; 130:1237-43.

GOMEZ-MOYANO, E.; ERCHIGA, V. C.; PILAR, L. M.; DIAZ, D. J. G. ¿Cuál es el valor real de los cutivos como herramienta diagnóstica em las onicomicoses? Rev. Iberoam Micol. 2015; 32(2):129-33.

GROVER, C.; REDDY, B. S. N.; CHATURVEDI, K. U. Onychomycosis and the Diagnostic Significance of Nail Biopsy. The Journal os Dermatology. 2003; 30:116-22.

GUPTA, A.K. Types of onychomycosis. Cutis. 2001; 68(2):4-7.

GUPTA, A.K.; DAIGLE, D.; FOLY, K.A. Skin Network Meta-Analysis of Onychomycosis Treatment. skin Appendage Disord. 2015; 1:74–81

GUPTA, A.K.; SIMPSON, F.C.; HELLER, D;F; The future of lasers in onychomycosis. J Dermatolog Treat. 2016;27(2):167-72.

HAGHANI, I.; SHOKOHI, T.; HAJHEIDARI, Z.; KHALILIAN, A.; AGHILI, S.R. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. Mycopathologia. 2013; 175(3-4):315-21.

HAJAR, T.; FERNÁNDEZ-MARTINEZ, R.; MORENO-COUTIÑO, G.; MERCADO E.V.; ARENAS, R. Modified PAS stain: A new diagnostic method for onychomycosis. Rev Iberoam Micol. 2016; 33(1):34-37.

HASSAB-EL-NABY, H. M. M.; SHAHEEN, I. M. I.; ABDO, H. M.; EL-SHAFFEY, H. A. M. Comparative study for the reliability of potassium hydroxide mount versus nail clipping biopsy in diagnosis of onychomycosis. The Gulf Journal of Dermatology and Venereology. 2011; 18(1):14-22.

HORTA DE LIMA, C.L.; MARQUES, M.E.A. In: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; et al. Compêndio de micologia médica. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2010, pg 26.

HSIAO, Y.P.; YANG, J. H.; LIN, H.S.; SHIH, H.C.; WEI, S.J.; WU, T.W.; WANG, Y.L.; LIN, K. L.; CHIOU, H. L. A comparative study of KOH tes, PAS staining and fungal culture in diagnotic is of onychomycosis in Taiwan. Journal of Dermatological Science. 2007; 45:138-40.

JILLSON, O. F.; PIPER, E. L. The role of saprophytic fungi in the production of eczematous dermatitis. The Journal of Investigative Dermatology. 1957; 137-46.

JUNG, M.Y.; SHIM, J.H.; LEE, J.H.; LEE, J.H.; YANG, J.M.; LEE, D-Y., JANG, K-T.; LEE, N.Y.; LEE, J-H.; PARK, J-H.; PARK, K.K. Comparison of diagnostic methods for onychomycosis, and proposal of diagnostic algorithm, Clinical and Experimental Dermatology. 2015; 40: 479-84.

KARIMZADEGAN-NIA, M.; MIR-AMIN-MOHAMMADI, A.; BOUARI, N.; FIROOZ, A. Comparison of direct smear, culture and histology for the diagnosis of onychomycosis. Australas J Dermatol. 2007; 48(1):18-21.

LACAZ C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica, 9a ed., Sarvier, São Paulo, 2002.

LAWRY, M.A.; HANEKE, E.; STROBECK, K.; MARTIN, S.; ZIMMER, B.; ROMANO, P.S. Methods of diagnosing onychomycosis. Arch Dermatol. 2000; 136:1112-6.

LILLY, K.K.; KOSHNICK, R.L.; GRILL, J.P.; KHALIL, Z.M.; NELSON, D.B.; WARSHAW, E.M. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: a repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests. J Am Acad Dermatol. 2006; 55(4):620-6.

LIU, H.N.; LEE, D.D.; WONG, C.K. KONCPA: a new method for diagnosing tinea unguium. Dermatology 1993; 187:166-8.

MACHLER B.C.; KIRSNER, R.S.; ELGART, G.W.. Routine histologic examination for the diagnosis of onychomycosis: an evaluation of sensitivity and specificity. Cutis. 1998; 61:217-9.

MAGALHÃES, M.G.; SUCCI, I.C.B.; SOUSA, M.A.J. Subsídios para estudo histopatológico das lesões ungueais. An Bras Dermatol. 2003; 78:49-61.

MAYER, E.; IZHAK, O. B.; BERGMAN, R. Histopathological Periodic Acid-Schiff Stains of Nail Clippings as a Second-Line Diagnostic Tool in Onychomycosis. Am J Dermatopathol. 2012; 34:270-3.

MEHREGAN, D.A.; MEHREGAN, D.R.; RINKER, A. Onychomycosis. Cutis. 1997; 59:247-8.

MIKAILOV A.; COHEN, J.; MOSTAGHIMI, A. Cost-effectiveness of confirmatory testing before treatment of onychomycosis. JAMA Dermatol. 2016; 152(3):276-81.

MILOBRATOVIC, D.; JANKOVIC, S.; VUKICEVIC, J.; MARINKOVIC, J.; JANKOVIC, J.; RAILIC, Z. Quality of life in patients with toenail onychomycosis. Mycoses. 2013; 56(5):543-51.

MORENO-COUTIÑO, G.; TOUSSAINT-CLAIRE, S.; ARENAS, R. Clinical, mycological and histological aspects of white onychomycosis. Mycoses. 2009; 53:144-7.

NAGAR, R.; NAYAK, C.S.; DESHPANDE, S.; GADKARI, R.P.; SHASTRI, J. Subungueal hyperkeratosis nail biopsy: a better diagnostic tool for onychomycosis. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2012; 78:620-4.

PIÉRARD, G. E.; QUATRESOOZ, P.; ARRESE, J. E. Spotlight on Nail Histomycology. Dermatol Clin. 2006; 24:371-4.

PIÉRARD, G.E.; ARRESE, J.E.; PIERRE, S.; BERTRAND, C.; CORCUFF, P.; LÉVÊGUE, J.L.; et al. Microscopic diagnosis of onychomycoses. Ann Dermatol Venereol. 1994; 121:25-9.

REISBERG, E.M.; ABELS, C.; LANDHALER, M.; SZEIMIES, R.M. Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid-Schiffstained nail clippings. Br J

Dermatol 2003; 148:749-54.

REZA-KERMANSHAHI T.; RHATIGAN R. Comparison between PAS and GMS stains for the diagnosis of onychomycosis. J Cutan Pathol. 2010; 37(10):1041-4.

RIBEIRO, C.S.; ZAITZ, C.; FRAMIL, V.M.; OTTOBONI, T.S.; TONOLI, M.S.; RIBEIRO, R.P. Descriptive study of onychomycosis in a hospital in Sao Paulo. Braz J Microbiol. 2015; 46(2):485-92.

SAGHER, F. Histologic Examinations of Fungous Infections os the Nails.The Journal of Investigative Dermatology. 1948; 337-57.

SCHER, R.K.; TOSTI, A.; JOSEPH, W.S.; VLAHOVIC, T.C.; PLASENCIA, J.; MARKINSON, B.C.; PARISER, D.M. Onychomycosis diagnosis and management: perspectives from a joint dermatology-podiatry roundtable. J Drugs Dermatol. 2015; 14(9):1016-21.

SCHERER, W. P.; SCHERER, M.D. Scanning Electron Microscope Imaging of Onychomycosis. J Am Podiatr Med Assoc. 2004;94(4):356-362.

SHENOY, M.M.; TEERTHANATH, S.; KARNAKER, V.K.; GIRISHA, B.S.; KRISHNA-PRASAD, M.S.; PINTO, J. Comparison of potassium hydroxide mount and mycological culture with histopathologic examination using Periodic Acid-Schiff staining of nail clippings in the diagnosis of onychomycosis. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2008; 74(3):226-30.

SOUZA, L.K.; FERNANDES, O.F.; PASSOS, X.S., COSTA, C.R., LEMOS, J.A., SILVA, M.R. Epidemiological and mycological data os onychomycosis in Goiania, Brazil. Mycoses. 2010; 53(1):68-71.

STEPHEN, S.; TOSTI, A.; RUBIN, A.I. Diagnostc applications of nail clippings. Dermatol Clin. 2015; 33(2):289-301.

SUAREZ, S.M.; SILVERS, D.N.; SCHER, R.K.; PEARLSTEIN, H.H.; AUERBACH, R. Histologic evaluation of nail clippings for diagnosing onychomycosis. Arch Dermatol. 1991; 127(10):1517-9.

SUMMERBELL, R.C.; COOPER, E.; BUNN, U.; JAMIESON, F.; GUPTA, A.K. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. Medical Mycology. 2005; 43(1):39-59.

TOSTI, A. Onychomycosis. Medscape, 2014. Disponível em: <www.medscape.com>. Acesso em: 10 de junho de 2014.

TURNER, R.R.; TESTA, M.A. Measuring the impat of onychomycosis on patient quality of life. Quality of life Research 2000; 9(1):39-53.

WEINBERG, J.M.; KOESTENBLATT, E.K.; TURONE, W.D.; TISHLER, H.R.; NAJARIAN, L. Comparison of diagnostic methods in te evaluation of onychomycosis. J Am Acad Dermatol. 2003; 46(2):196-7.

WERNER, B.; ANTUNES, A. Microscopic examination of normal nail clippings.

Dermatol Pract Concept. 2013; 3(3):9-14.

WERNER, B.; FONSECA, G.P.; SEIDEL, G. Microscopic nail clipping findings in patients with psoriasis. Am J Dermatopathol. 2015 Jun;37(6):429-39.

WILSMANN-THEIS, D.; SAREIKA, F.; BIEBER, T.; SCHMID-WNDTNER, M.H.; WENZEL, J. New reasons for histopathological nail-clipping examination in the diagnosis of onychomycosis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011; 25(2):235-7.

YUE, X.; LI, Q.; WANG, H.; SUN, Y.; WANG, A.; ZHANG, Q.; ZHANG, C. An ultrastructural study of *Trichophyton rubrum* induced onychomycosis. BMC Infectious Diseases. 2015; 15:532.

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; FRAMIL, V.M.S. Compêndio de micologia médica. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2010.

APÊNDICE I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Dra. Betina Werner, Dra. Flávia Trevisan e Prof. Rosângela Lameira Pinheiro, pesquisadoras da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o (a) senhor (a), paciente do ambulatório de dermatologia do Hospital de Clínicas, a participar de um estudo intitulado “Exame microscópico da unha (clipping) na classificação do agente etiológico da onicomicose”, que trata de uma pesquisa sobre um método de exame para diagnóstico das micoses de unha. Essa pesquisa servirá para aprimorar a lista de exames úteis nesse tipo de investigação. O objetivo desta pesquisa é investigar fragmentos de unhas de pacientes que tenham suspeita de onicomicose (micose de unha), a fim de descrever as alterações e relacionar à clínica e ao tipo de fungo presente.

Caso você concorde em participar e da pesquisa, será necessário colher dois fragmentos da unha com suspeita de estar acometida por micose. A coleta é fácil e indolor, realizada com um cortador de unha limpo e não contaminado, da mesma maneira que é feito o corte normal das unhas.

Para tanto você deverá comparecer no ambulatório de dermatologia no SAM 4 para coleta do material, permanecendo uma semana sem utilizar cremes, medicamentos, talco ou outros produtos nas unhas acometidas. Quando o resultado do exame estiver disponível, retornar para as consultas médicas de acompanhamento conforme a orientação de rotina do atendimento.

Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser leve desconforto ao cortar a unha, resultado não ser definitivo, necessidade de repetir o exame. Os benefícios esperados com essa pesquisa são melhorar um meio de examinar e diagnosticar micoses de unha, aumentar a utilidade do exame, facilitar e agilizar o diagnóstico, acelerando o início dos tratamentos. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo poderão ser contatados para esclarecer eventuais dúvidas que o (a) sr(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo. Os contatos com a pesquisadora Dra. Flávia Trevisan são telefones: 3360-7899 (SAM 4, terças a tarde) e 3024-0607 (profissional) e e-mail: flaviatrevisan1@gmail.com. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP, na rua Gal. Carneiro, 181, Curitiba, telefone: 3360-1041 e e-mail: cep@hc.ufpr.br. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Se qualquer informação do estudo for divulgada em relatório ou

Rubricas:	
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal	_____
Pesquisador ou quem aplicou o TCLE	_____



publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

Pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. O acompanhamento, resultado do exame e continuidade do tratamento seguirá de maneira inalterada de acordo com a rotina do serviço de dermatologia, não sofrendo interferências pelo estudo.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi que não receberei valores por participar da pesquisa e que meu tratamento continuará sendo indicado pela equipe do serviço de dermatologia.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

(Nome e assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)

Curitiba, ____ de _____ de _____.

(Nome e assinatura do pesquisador ou quem aplicou o TCLE)

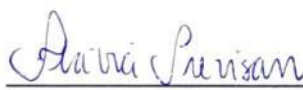
Curitiba, ____ de _____ de _____.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP


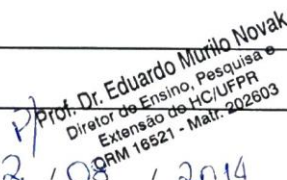
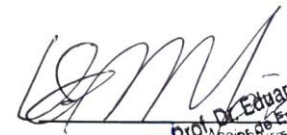

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Clipping ungueal na oncomicosose e sua correlação com achados de cultura			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 105			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Flávia Trevisan			
6. CPF: 040.994.549-83		7. Endereço (Rua, n.º): MARECHAL MALLET SAO PEDRO 181 SAO JOSE DOS PINHAIS PARANA 83005530	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: (41) 9550-2000	10. Outro Telefone:	11. Email: flaviatrevisan1@gmail.com
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: <u>27</u> / <u>07</u> / <u>16</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná		13. CNPJ: 75.095.679/0002-20	
14. Unidade/Órgão:			
15. Telefone: (41) 3360-1839		16. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: _____		CPF: <u>91854073920</u>	
Cargo/Função: _____			
Data: <u>28</u> / <u>07</u> / <u>16</u>		 Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa. Exame microscópico da unha (clipping) na classificação do agente etiológico da onicomicose		2. Número de Participantes da Pesquisa: 100	
3. Área Temática: Micologia			
4. Área do Conhecimento. Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Flávia Trevisan			
6. CPF: 040.994.549-83		7. Endereço (Rua, n.º): MARECHAL MALLET SAO PEDRO 181 SAO JOSE DOS PINHAIS PARANA 83005530	
8. Nacionalidade: BRASILEIRO		9. Telefone: (41) 9550-2000	10. Outro Telefone: 11. Email: flaviatrevisan1@gmail.com
12. Cargo: Médica voluntária			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: 12 / 08 / 14		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná		14. CNPJ: 75.095.679/0002-20	
15. Unidade/Orgão:			
16. Telefone: (41) 3360-1896		17. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: _____		CPF: _____	
Cargo/Função: _____		_____	
Data: 22 / 08 / 2014 		 	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			

ANEXO 2 – COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA ONICOMICOSE EM DIFERENTES ESTUDOS

Estudo	N	Casos positivos	Método	Resulta dos positivo s do método	% positividad e
Suarez et al (1991) Grupo A	92	92			
Grupo B		74	<i>Clipping</i>	18	100,0
			Cultura	17	94,0
			<i>Clipping</i>	20	27,0
			Cultura	14	19,0
Liu et al (1993)	43	33	<i>Clipping</i>	28	84,8
			EMD	19	57,6
			EMD-PAS	33	100,0
			Cultura	23	69,7
Mehregan et al (1997)	20	20	<i>Clipping</i>	15	75,0
			Cultura	12	60,0
Machler et al (1998)	12	4	<i>Clipping</i>	4	100,0
			EMD	3	75,0
			Cultura	4	100,0
Lawry et al (2000)	63	47	<i>Clipping</i>	40	85,0
			EMD-PAS	27	57,0
			EMD-CW	25	53,0
			EMD-CB	25	53,0
			Cultura Mycosel	15	32,0
			Cultura Littman-oxgall	11	23,0
Borkowski et al (2001)	50	36	<i>Clipping</i>	36	100,0
			EMD	16	44,4
			Cultura	12	33,3
Hassab-El-Naby (2001)	40	30	<i>Clipping</i>	30	75,0
			EMD	23	57,5
Gianni et al (2001)	172	112	<i>Clipping</i>	94	84,0
			EMD	102	91,0
			Cultura	90	80,0
Weinberg et al (2003)	105	93	<i>Clipping</i>	78	83,9
			EMD	69	74,2
			EMD-CW	76	81,7
			Cultura	50	53,8
Reisberger et al (2003)	350	234	<i>Clipping</i>	166	70,9
			EMD	147	62,8
			Cultura	97	41,5
Alberhasky (2004)	737	510	<i>Clipping</i>	437	85,7
			Cultura	312	61,2
Hsiao et al (2006)	88	78	<i>Clipping</i>	68	87,0
			EMD	63	81,0
			Cultura	52	67,0
Lilly et al (2006)	204	191	<i>Clipping</i>	162	84,8
			EMD	128	67,0
			EMD dermatologista	149	78,0
			EMD técnico	144	75,4
			EMD-CB	132	69,1
			Cultura	130	68,1
			Meio de teste para dermatófito	94	49,2
Chang et al (2007)	87	66	<i>Clipping</i> – subungueal	64	96,7
			<i>Clipping</i> – placa	2	3,3

Karimzadegan-Nia et al (2007)	96	47	<i>Clipping</i>	38	80,8
			<i>Clipping</i> + EMD	46	97,8
			<i>Clipping</i> + cultura	37	78,8
			EMD	36	76,5
			Cultura	25	53,2
Shenoy et al (2008)	101	84	<i>Clipping</i>	76	90,5
			EMD	54	64,3
			Cultura	35	41,7
Alkhayat et al (2009)	141	141	<i>Clipping</i>	54	38,3
			EMD	32	22,7
			Cultura	58	41,1
Moreno-Coutinho et al (2009)	10	9	Bx ungueal	9	100,0
			EMD	8	88,9
			Cultura	4	44,4
Wilsmann-Theis (2011)	1146	631	<i>Clipping</i>	517	81,9
			EMD	302	47,8
			Cultura	334	52,9
Hassab El-Naby et al (2011)	40	30	<i>Clipping</i>	23	76,6
			EMD	30	100
Nagar et al (2012)	68	34			
		34	<i>Clipping</i> – PAS	31	91,2
			<i>Clipping</i> – H&E	18	52,9
			EMD	26	76,5
			Cultura	12	35,3
		34	<i>Clipping</i> – PAS	30	88,2
			<i>Clipping</i> – H&E	14	41,2
			EMD	17	50,0
			Cultura	10	29,4
Haghani et al (2013)	101	100	<i>Clipping</i>	100	99,0
			EMD	86	85,1
			EMD-CW	92	91,1
			Cultura	75	74,2
Jung et al (2015)	493	371			
	400	303	<i>Clipping</i>	282	93,1
			Cultura	150	49,5
	93	68	<i>Clipping</i>	60	88,2
			EMD	38	55,9
			Cultura	20	29,4
Blake (2015)	108	76	<i>Clipping</i>	65	85,5
			EMD	47	61,8
			Cultura	43	56,6
Hajar et al (2016)	192	152	EMD-PAS	143	94,0
			EMD-CB	113	73,8
			Cultura	35	23,0

FONTE: PubMed.

NOTAS: EMD – Exame micológico direto. EMD-CB – Exame micológico direto com Clorazol Black. EMD-CW – Exame micológico direto com Calcofluor-White. EMD-PAS – Exame micológico direto com Ácido Periódico de Schiff. Bx – biópsia.

% Positividade: número de casos positivos no método dividido pelo número de casos positivos por qualquer um dos métodos do estudo.

ANEXO 3 – PRINCIPAIS CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE DERMATÓFITOS

Tipos de critérios	Parâmetros que podem ser observados
Macromorfológicos	Velocidade de crescimento, textura, topografia e cor do micélio e formação de pigmento reverso nas colônias, nos meios de cultura.
Micromorfológicos	Presença de modificações de hifas como gavinhas, candelabros fávicos, hifas em “raquete” e clamidoconídeos no micélio.
Fisiológicos	Assimilação de uréia, estimulação de crescimento em presença de vitaminas (tiamina, ácido nicotínico), aminoácidos (histidina) e álcoois (inositol); perfuração de pelo “in vitro”.

FONTE: Lacaz et al. (1991)

ANEXO 4 – AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGENS

26/07/2016

Gmail - RE: About "Scanning Electron Microscope Imaging of Onychomycosis", 2004



Flávia Trevisan <flaviatrevisan1@gmail.com>

RE: About "Scanning Electron Microscope Imaging of Onychomycosis", 2004

Michael Scherer <michael@scherrer.net>

3 de julho de 2016 10:12

Para: Flávia Trevisan <flaviatrevisan1@gmail.com>

Flavia,

Thank you for contacting me. You are welcome to reprint the image.

Regards,

-Michael D Scherer, DMD, MS, FACP

Diplomate, American Board of Prosthodontics

Practice: www.SonoraModernDental.com

Personal/Consulting: www.MichaelSchererDMD.com

From: Flávia Trevisan [mailto:flaviatrevisan1@gmail.com]

Sent: Saturday, July 2, 2016 10:25 AM

To: michael@scherrer.net

Subject: About "Scanning Electron Microscope Imaging of Onychomycosis", 2004

Dear sir M. Scherer,

I gently would like to ask for your authorization to expose your espetacular image of SME morphology of the ventral part of the toenail (figure 3 of your article) and artrospores (figures 10 and 11), in my master degree manuscript.

Thank you for your attention and congrats for high cientific quality of your work.


Flavia Trevisan


Dermatologist, master degree in progress in Federal University of Parana, Brazil.


ANEXO 5 – SUBMISSÃO DE ARTIGO EM REVISTA INDEXADA INTERNACIONAL


20/09/2016

ScholarOne Manuscripts


Journal of Cutaneous Pathology

 Home

 **Author**

 Review

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Cutaneous Pathology

Manuscript ID

CUP-O-382-2016

Title

Nail clipping in onychomycosis and its correlation with culture finds

Authors

Trevisan, Flavia

Werner, Betina

Pinheiro, Rosangela

Date Submitted

20-Sep-2016

[Author Dashboard](#)

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2016. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) |
 [System Requirements](#) |
 [Privacy Statement](#) |
 [Terms of Use](#)

ANEXO 6 – PARECER DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA - MESTRADO E DOUTORADO

PARECER

Aos vinte e oito dias do mês de novembro do ano de dois mil e dezesseis, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dr. Luiz Eduardo Agner Machado Martins (Depto. Dermatologia - FEPAR), Dra. Kátia Sheylla Malta Purim (UFPR) e Orientadora Dra. Betina Werner (UFPR), exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por FLÁVIA TREVISAN, pós-graduanda concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “CLIPING UNGUEAL NA ONICOMICOSE E SUA CORRELAÇÃO COM ACHADOS DE CULTURA”. A Banca examinadora considerou que a aluna apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna**, após publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Dr. Luiz Eduardo Agner Machado Martins

Dra. Kátia Sheylla Malta Purim

Dra. Betina Werner (UFPR)